

ARCHIV
FÜR
MIKROBIOLOGIE

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
JUN 24 '64

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

H. L. JENSEN
LYNGBY

C. B. VAN NIEL
PACIFIC GROVE

R. NILSSON
UPPSALA

G. PIEKARSKI
BONN

E. G. PRINGSHEIM
GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE

W. H. SCHOPFER
BERN

H. TAMIYA
TOKIO

T. WIKÉN
DELFT

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES
GÖTTINGEN

R. HARDER
GÖTTINGEN

32. BAND · 1. HEFT

MIT 93 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 13. NOVEMBER 1958)



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1958

Per.
QR 1
Ar 25

Arch.
Mikrobiol.

Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930 von
J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96,—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20,— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30,— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40,— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. H. L. Jensen, Lyngby/Dänemark, Statens Planteavlslaboratorium, Bakteriologisk Afdeling,

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. G. Pickarski, Bonn/Rh., Venusberg, Hygienisches Institut (medizinisch-parasitologische Abteilung) der Universität,

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Untere Karspüle, Pflanzenphysiologisches Institut,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,

Prof. Dr. T. Wiken, Delft/Holland, Julianalaan 67 A, Laboratorium voor Microbiologie, Technische Hogeschool

oder an die

Schriftleitung:

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Albrechtstraße 6,

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Untere Karspüle 2

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

32. Band

Inhaltsverzeichnis

	1. Heft Seite
RADLER, F., Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. II. Der Nähr- und Wuchsstoffbedarf der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien	1
BAHADUR, K., and J. N. DUBE, Study of 2,3-Butanediol Formation by <i>Serratia marcescens</i>	16
UNGER, H., 2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumsalz als Hilfsmittel bei der Keimzählung nach dem Kochschen Gußplatten-Verfahren	20
VERONA, O., e O. Z. DE TOLEDO, Reisolamento di una rara specie di Lievito: <i>Trigonopsis variabilis</i> Schachner. Con 4 figure nel testo	25
SANTA MARIA, J., <i>Sporobolomyces marcillae</i> nov. spec., isolated from the air. With 3 Figures in the text	29
LEEDALE, G. F., Nuclear structure and Mitosis in the Euglenineae. With 29 Figures in the text	32
ECKSTEIN, B., Karyologische Untersuchungen an einer Wildhefe. Mit 36 Textabbildungen	65
SCHRADER, R., Untersuchungen zur Biologie der Erbsenmycorrhiza. Mit 21 Textabbildungen	81

(Aus der Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen
über Landau/Pfalz)

Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein

II. Der Nähr- und Wuchsstoffbedarf der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien

Von

FERDINAND RADLER

(Eingegangen am 4. Mai 1958)

Nach Beendigung der Gärung von Wein erfolgt häufig — aber nicht regelmäßig — ein Abbau der in Trauben- oder Obstmosten vorkommenden Äpfelsäure zu Milchsäure und Kohlensäure. Dieser Säurerückgang im Wein wird gewöhnlich „biologischer Säureabbau“ genannt. Die durch den biologischen Säureabbau verursachte Verminderung des Gesamtsäuregehaltes ist bei deutschen Weinen meist erwünscht, da dadurch der Geschmack saurer Weine verbessert werden kann. Es ist daher von Bedeutung, die Voraussetzungen für diesen enzymatischen Vorgang möglichst genau zu kennen.

Die Ursache des enzymatischen Abbaus der Äpfelsäure in Most oder Wein sind Milchsäurebakterien (MÜLLER-THURGAU u. OSTERWALDER 1913, SCHANDERL 1950), die nach der heute gebräuchlichen Nomenklatur zu den Gattungen *Leuconostoc*, *Pediococcus* und *Lactobacillus* gehören (BIDAN 1956, FORNACHON 1957, RADLER 1958). In frischen Traubenmosten sind diese Bakterien gewöhnlich nur in sehr geringer Zahl vorhanden (RADLER 1958); es kann daher mit Sicherheit angenommen werden, daß sich diese Bakterien im Most oder Wein vermehren, ehe der meist vollständige Abbau der Äpfelsäure erfolgt, von der im Traubenmost in der Regel mehr als 4 g je Liter enthalten sind. Voraussetzungen für eine Vermehrung der Bakterien im Traubenmost sind das Vorhandensein der erforderlichen Nähr- und Wuchsstoffe, sowie geeignete chemische und physikalische Bedingungen. In der vorliegenden Arbeit wird zur Klärung des Nährstoffbedarfs der säureabbauenden Bakterien ein chemisch definiertes Nährmedium entwickelt, das das Wachstum von 4 aus Wein isolierten, Äpfelsäure-abbauenden Bakterienstämmen ermöglicht. Die Zusammensetzung dieses Mediums wird mit den normalerweise im Most und Wein vorkommenden Vitaminen und Aminosäuren verglichen. Durch Prüfung, welche der einzelnen Bestandteile für die Entwicklung der Bakterien und die Decarboxylierung der Äpfelsäure unumgänglich notwendig sind, soll ein Einblick in die Nährstoffansprüche der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien und damit eine der Voraussetzungen für den biologischen

Säureabbau gewonnen werden. Die an synthetischen Nährlösungen gewonnenen Vorstellungen über den Nährstoffbedarf der säureabbauenden Bakterien werden ergänzt, indem die Aminosäurezusammensetzung von Bakterien bestimmt wird, die in steril filtriertem Traubenmost gezüchtet worden sind.

Material und Methoden

1. Mikroorganismen. Für die Untersuchungen wurden ein Stamm von *Lactobacillus plantarum* (L. arabinosus 17-5) und die aus Wein isolierten Bakterienstämme 2L, 12a, 16a und 45b verwendet, die die Fähigkeit haben, L-Äpfelsäure zu decarboxylieren. Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt (RADLER 1958), daß Stamm 2L *Lactobacillus plantarum* und die Stämme 12a, 16a, 45b *Leuconostoc citrovorum* nahestehen, ohne mit diesen Organismen identisch zu sein. Die Bakterienstämme werden seit ihrer Isolierung im Herbst 1956 in Tomatensaftagar in Stichkulturen bei +5° gehalten, etwa alle 4 Wochen in frisches Medium übertragen und einige Tage bei +23°C bebrütet. Die aus Wein isolierten Stämme wuchsen offensichtlich nach längerer Kultur in Tomatensaftagar schneller und besser als kurz nach der Isolierung, eine bereits für viele Mikroorganismen beschriebene Beobachtung.

2. Nährlösungen. Die Herstellung der synthetischen und halbsynthetischen Nährlösungen (Zusammensetzung siehe Tab. 1, S. 4. und S. 7.) erfolgte entsprechend den von MÜCKE (1955) zusammengefaßten Vorschriften zur Herstellung von Nährmedien für die mikrobiologische Bestimmung von Vitaminen und Aminosäuren. Soweit möglich, wurden nur p.a. Reagentien verwendet. Die Aminosäuren wurden ohne vorhergehende Umkristallisation nach Lösen in n/10 Salzsäure (Tyrosin in n/10 NaOH) zur Herstellung der Nährlösungen verwendet. Von den Vitaminen wurden Stammlösungen angesetzt, die unter Toluol bei +5°C aufbewahrt wurden. Cystein, Tween 80, Vitamin B₁₂ und Ascorbinsäure wurden in einer Lösung steril filtriert und dem Gesamtmedium zugesetzt, das 5 min bei 0,8 Atmosphären Überdruck in Reagensgläsern zu 5 ml autoklaviert wurde.

3. Herstellung der Impfsuspension. Die Bakterienstämme wurden etwa 4 Tage in Tomatensaftlösung bei 23°C vorkultiviert. Nach Zentrifugieren und dreimaligem Waschen mit dest. Wasser wurden zum Beimpfen der Teströhrchen 1-2 Tropfen einer Suspension verwendet, die etwa 0,01 mg Bakterienmasse je Milliliter enthielt, was durch Trübungsmessung überprüft wurde.

4. Bestimmungsmethoden. Die Bakterienmasse wurde durch Trübungsmessung mit durchfallendem Licht in standardisierten Reagensgläsern mit dem Becherglascolorimeter (Lange) unter Verwendung eines Rotfilters bestimmt. Die Mengenangaben (Milligramm Bakterienmasse je Milliliter) beziehen sich auf die Eichkurve einer Suspension von Zellen des Stammes 2L in Wasser. — pH-Wertmessung und Titration mit Beckmanpotentiometer und Glaselektrode.

5. Papierchromatographie. Carbonsäuretrennung eindimensional aufsteigend in n-Butanol: Ameisensäure: Wasser = 100:20:9, Entwicklung mit Bromthymolblaulösung. Aminosäuretrennung zweidimensional aufsteigend in n-Butanol: Eisessig: Wasser = 4:1:5 und Phenol: Wasser = 10:1 mit 0,1% Cupron in der Steigflüssigkeit und 0,1% KCN im 1%igen Sättigungsphenol. Entwicklung mit Ninhydrinlösung.

Ergebnisse

Voraussetzung für die Untersuchung der Nährstoffansprüche von Bakterien ist die Kultur in chemisch definierten Medien, da der andere Weg, die möglichst vollständige Analyse eines für das Wachstum der Bakterien

geeigneten, komplexen organischen Nährsubstrates in der Regel nicht durchführbar ist. Von den aus Wein isolierten Bakterien, die die Fähigkeit haben, L-Äpfelsäure unter anaeroben Bedingungen zu decarboxylieren, war zunächst nur bekannt, daß sie in Tomatensaftlösung oder als Stichkulturen in Tomatensaftagar gezüchtet werden können. Jedoch bereitete selbst in diesem komplexen Medium vor allem die Übertragung der frisch isolierten Stämme Schwierigkeiten, so daß die Aussichten für die Kultur in einem synthetischen Medium gering waren, zumal die säureabbauenden Bakterien als schwer züchtbar gelten. Bisher wird lediglich von LÜTHI (1957) angegeben, daß es gelungen ist, ein aus Wein isoliertes Bakterium (*Bacterium gracile*) in einem synthetischen Medium nach SNELL zu kultivieren, ohne daß jedoch nähere Einzelheiten angegeben werden.

Da es sich bei den Äpfelsäure-abbauenden Bakterien des Weines um Milchsäurebakterien handelt, war anzunehmen, daß diese Bakterien in einem aus bekannten Verbindungen zusammengesetzten Medium kultiviert werden können. Der Stoffwechsel und die hochdifferenzierten Nährstoffansprüche einer Reihe von Milchsäurebakterien sind wegen ihrer technischen Bedeutung und wegen der Möglichkeit, diese Bakterien zur Bestimmung von Vitaminen und Aminosäuren zu verwenden, schon eingehend untersucht worden.

Zunächst wurden verschiedene, für Milchsäurebakterien geeignete, synthetische Nährlösungen hergestellt und versucht, die säureabbauenden Bakterien darin zu kultivieren. Während Stamm 2L bereits in einer für *Lactobacillus arabinosus* beschriebenen Nährlösung (BARTON-WRIGHT 1952) wuchs, sofern 0,25 µg Folsäure je Milliliter zugesetzt wurden, vermochten die meisten anderen Nährlösungen kein oder nur ein sehr geringes Wachstum der Stämme 12a, 16a und 45b hervorzubringen, gleichgültig, ob die Kultur bei Luftzutritt, bei Unterdruck (etwa 20 mm Hg) oder unter Kohlensäureatmosphäre erfolgte. Schließlich gelang es auch, das Wachstum der heterofermentativen Stämme 12a, 16a und 45b in einer Nährlösung zu erzielen, deren Zusammensetzung durch Verbesserung und Weiterentwicklung einer von KOSER u. THOMAS (1955) für *Lactobacillus acidophilus* angegebenen Nährlösung erhalten wurde. Die Zusammensetzung dieser Nährlösung (siehe Tab. 1) ist sicher vor allem für die heterofermentativen Stämme noch nicht optimal, wie ein Vergleich des Wachstums der Bakterien in Tomatensaft und synthetischer Nährlösung zeigt, siehe Tab. 2 (S. 5). Im Vergleich zu den homofermentativen Stämmen *Lactobacillus plantarum* und 2L sind Wachstum und Säurebildung der heterofermentativen Stämme allerdings auch in Tomatensaftlösung wesentlich geringer. In dem synthetischen Medium wird ebenfalls nur ein schwaches Wachstum dieser Stämme erreicht, es genügt jedoch, um den Abbau von 5 mg L-Äpfelsäure je Milliliter durchzuführen, was etwa der Menge entspricht, die gewöhnlich im Traubenmost vorkommt.

Die Zusammensetzung der synthetischen Nährlösung, die Wachstum und Äpfelsäureabbau der Bakterien ermöglicht, wird in Tab. 1 mit der

Tabelle 1. Zusammensetzung der synthetischen Nährlösung für Äpfelsäure-abbauende Bakterien im Vergleich mit den in Most und Wein vorkommenden Stoffen (Ohne Berücksichtigung der Unterschiede zwischen Most und Wein)

	Synthe- tische Nähr- lösung je Liter	Most und Wein je Liter		Synthe- tische Nähr- lösung je Liter	Most und Wein je Liter
D,L- α -Alanin . . .	200 mg	20 mg ¹	Thiamin . . .	0,2 μ g	0,3—0,7 mg ³
D,L- α -Amino- buttersäure . . .	50 mg	?	Riboflavin . . .	0,2 mg	0,1—0,3 mg ⁴
D,L- γ -Amino- buttersäure . . .	50 mg	5 mg ¹	Pyridoxin u. Pyridoxamin	0,6 mg	0,3—2,9 mg ⁵
L-Arginin . . .	100 mg	100—1000 mg ²	Cobalamin . . .	0,01 mg	0,1 μ g ⁶
L-Asparagin . . .	50 mg	?	Nicotinsäure u. -amid . . .	1,0 mg	1,8—8,8 mg ⁵
L-Asparaginsäure	400 mg	5—90 mg ²	Biotin . . .	0,01 mg	1—60 μ g ⁵
L-Cystin/Cystein	100 mg	2—5 mg ²	p-Aminoben- zoessäure . . .	0,1 mg	vorh.
L-Glutaminsäure	400 mg	10—1000 mg ²	Folsäure . . .	0,25 mg	vorh.
Glykokoll . . .	100 mg	3—15 mg ²	Inosit . . .	20 mg	200—700 mg ⁷
L-Histidin . . .	100 mg	20—140 mg ²	Glucose . . .	15 g	> 2 g
D,L-Isoleucin . . .	100 mg	20—100 mg ²	Xylose oder		
D,L-Leucin . . .	100 mg	15—80 mg ²	Arabinose . . .	1 g	?
L-Lysin . . .	100 mg	5—20 mg ²	Natriumacetat	10 g	vorh.
D,L-Methionin . . .	100 mg	5—20 mg ²	L-Äpfelsäure . . .	5 g	> 4 g
L-Ornithin . . .	—	5 mg ¹	Citronensäure	0,5 g	vorh.
L-Oxyprolin . . .	50 mg	?	D,L-Milchsäure	0,5 g	vorh.
D,L-Phenylalanin	100 mg	5—80 mg ²	Bernsteinsäure	0,5 g	vorh.
L-Prolin . . .	100 mg	350—480 mg ²	Ascorbinsäure	0,3 g	vorh.
D,L-Serin . . .	100 mg	50—200 mg ²	Tween 80 . . .	0,1 g	
D,L-Threonin . . .	100 mg	5—60 mg ²	NaCl . . .	0,01 g	
L-Tryptophan . . .	100 mg	10—40 mg ²	MnSO ₄ · aq. . .	0,01 g	1 mg Mn ⁸
L-Tyrosin . . .	100 mg	10—90 mg ²	FeSO ₄ · aq. . .	0,01 g	vorh.
D,L-Valin . . .	100 mg	?	MgSO ₄ · aq. . .	0,5 g	vorh.
Orotsäure . . .	20 mg	?	NH ₄ Cl . . .	3,0 g	vorh.
Xanthin . . .	5 mg	?	KH ₂ PO ₄ . . .	3,0 g	vorh.
Adenin . . .	10 mg	?			
Guanin . . .	10 mg	?			
Uracil . . .	10 mg	?			

¹ LÜTHI u. VETSCH (1953), ² CASTOR (1952), ³ HALL u. Mitarb. (1956), ⁴ LA-FOURCADE u. PEYNAUD (1957), ⁵ RADLER (1957), ⁶ PEYNAUD u. LAFOURCADE (1955a), ⁷ PEYNAUD u. LAFOURCADE (1955b), ⁸ WÜRZIGER (1954). — vorh. = vorhanden.

Zusammensetzung von Most und Wein verglichen, soweit dafür Untersuchungsergebnisse bekannt und zugänglich sind. Dieser Vergleich ist von Bedeutung, weil dadurch untersucht werden kann, ob im Most oder Wein die von den Bakterien benötigten Stoffe überhaupt vorkommen

und normalerweise in genügender Menge vorhanden sind. Es kann somit die Frage geprüft werden, ob zu erwarten ist, daß die Entwicklung der säureabbauenden Bakterien durch einen Mangel an notwendigen Nährstoffen eingeschränkt oder unterdrückt wird, oder ob andere Faktoren die Entwicklung der säureabbauenden Bakterien beeinflussen.

Tabelle 2. Vergleich von Wachstum und Säurebildung der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien in Tomatensaftlösung, synthetischer Nährlösung (Tab. 1, Seite 4) und halbsynthetischer Nährlösung (siehe S. 7)

Messungen nach etwa 14tägigem Wachstum bei 23°C

Bakterienstamm	<i>L. plantarum</i>	2 L	12 a	16 a	45 b
<i>Tomatensaftlösung</i>					
Bakterienmasse (mg je ml)	0,81	0,89	0,55	0,36	0,47
Säurebildung (ml n/100 KOH je ml)	1,53	1,54	0,79	0,80	0,77
pH-Wert	3,45	3,45	4,0	4,0	4,0
<i>Synthetische Nährlösung</i>					
Bakterienmasse (mg je ml)	1,43	0,28	0,26	0,10	0,13
Säurebildung (ml n/100 KOH je ml)	0,84	0,63	0,26	n. b.	0,0 ¹
pH-Wert	3,95	4,30	4,85	n. b.	5,45
<i>Halbsynthetische Nährlösung</i>					
Bakterienmasse (mg je ml)	0,72	0,60	0,23	0,12	0,07
Säurebildung (ml n/100 KOH je ml)	0,84	1,13	0,24	0,26	0,05 ¹
pH-Wert	3,60	3,40	4,45	4,35	5,25

¹ Durch die Decarboxylierung der Äpfelsäure wird die nur geringe Säurebildung überdeckt.

Die für die Zusammensetzung von Most und Wein angegebenen Werte sind natürlich mit größtem Vorbehalt zu betrachten; es sind zum Teil Extremwerte und manche Zahlen beruhen auf Schätzungen. Soweit der Gehalt von Most und Wein an den einzelnen Stoffen untersucht worden ist, sind die in der synthetischen Nährlösung vorhandenen Substanzen ausnahmslos nachgewiesen worden. Es ist wahrscheinlich, daß auch die Verbindungen der synthetischen Nährlösung in Most und Wein vorkommen, deren Gehalt darin noch nicht untersucht worden ist. Die qualitative Zusammensetzung von Most und Wein entspricht weitgehend der für das Wachstum der säureabbauenden Bakterien geeigneten Nährlösung. Es bestehen jedoch bei einzelnen Stoffen Unterschiede in der Konzentration. Die im Most und Wein vorkommenden Mengen an den einzelnen Verbindungen sind im allgemeinen so groß, daß nicht zu erwarten ist, daß das Wachstum der säureabbauenden Bakterien durch einen Mangel an diesen Substanzen verhindert wird. Die größten Konzentrationsunterschiede sind bei einigen Aminosäuren zu beobachten (Cystin,

Glykokoll), was sich jedoch bei näherer Betrachtung nicht als wesentlich für den Ablauf des Säureabbaus erweist.

Die synthetische Nährlösung ist nämlich — wie später eingehender gezeigt wird — keine Minimalnährlösung, sondern enthält die Nähr- und Wuchsstoffe in einer im Vergleich zum Bedarf viel zu hohen Konzentration. In einem Vorversuch konnte ein Bakterienstamm 3 mg L-Äpfelsäure je Milliliter noch vollständig abbauen, selbst wenn die Grundnährlösung auf das Achtfache verdünnt wurde. Außerdem kommen im Most die Aminosäuren nur in der natürlichen, für die Bakterien wirksamen L-Form vor, während für die synthetische Nährlösung teilweise die D,L-Formen verwendet wurden, von denen in der Regel von den Bakterien nur die L-Form, also die Hälfte, ausgenutzt werden kann. Eine Anzahl von Aminosäuren ist im Most und Wein sogar in weit höherer Konzentration vorhanden als in der synthetischen Nährlösung.

Für die Vitamine gelten die gleichen Verhältnisse. Außer Cobalamin (Vitamin B₁₂), das aber für die säureabbauenden Bakterien wahrscheinlich nicht unbedingt erforderlich ist, kommen alle Vitamine im Most oder Wein in gleicher oder sogar höherer Konzentration vor als in der synthetischen Nährlösung. Analysenwerte über die wichtige Folsäure, deren Gehalt im Wein kürzlich von PEYNAUD bestimmt worden ist, waren leider nicht zugänglich. Es ist jedoch anzunehmen, daß die weitverbreitete Folsäure auch im Most und Wein in ausreichender Konzentration vorkommt. Über den Gehalt an Purin- und Pyrimidinverbindungen sind mir keine Untersuchungsergebnisse bekannt. Als Kohlenstoffquelle kommen Glucose und Fructose im Most und Wein stets in Mengen vor, die für das Wachstum der säureabbauenden Bakterien völlig genügen. Das gleiche gilt für die Carbonsäuren und Mineralsalze. Selbst Mangan, das für den Säureabbau als Cofactor des „malic enzyme“ (OCHOA 1952) von besonderer Bedeutung ist, wird im Wein in ausreichenden Mengen gefunden.

Wird außerdem noch berücksichtigt, daß zum vollständigen Abbau der Äpfelsäure in einem Most nur die Entwicklung einer sehr geringen Bakterienmenge erforderlich ist (siehe Tab. 3), so ist nicht daran zu zweifeln, daß die im Most und Wein vorhandenen Nähr- und Wuchsstoffe ausreichen, um das Wachstum der für den Säureabbau notwendigen Bakterien zu gewährleisten. Wie Tab. 3 zeigt, genügen zum Abbau von etwa 5 g L-Äpfelsäure im Most schon etwa 50 mg Bakterienmasse je Liter; das ist eine geringere Menge an Bakterien als die synthetische Nährlösung — und zum Teil auch Traubenmost — an einer einzelnen Aminosäure enthält! Es dürfte demnach sicher sein, daß der biologische Säureabbau durch andere Faktoren begrenzt wird als durch den Mangel an Nähr- oder Wuchsstoffen für die säureabbauenden Bakterien.

Zur Ergänzung dieser Untersuchungen wurde nun im einzelnen geprüft, welche der Bestandteile der synthetischen Nährlösung für das Wachstum

der säureabbauenden Bakterien unumgänglich notwendig sind. Dafür wurden Wachstum, Säurebildung und Äpfelsäureabbau der Bakterien nach Kultur in Nährlösungen bestimmt, denen jeweils eine Verbindung fehlte.

Tabelle 3. In einem steril filtrierten Traubenmost nach etwa 20 Tagen gewachsene Bakterienmasse, die ausreichte, um etwa 5 mg L-Äpfelsäure je Milliliter vollständig zu decarboxylieren

Bakterienstamm	<i>L. plantarum</i>	2 L	12 a	16 a	45 b
Bakterienmasse (mg je ml)	0,27	0,11	0,07	0,05	0,04

Tab.4 gibt die Hemmung des Bakterienwachstums und der Säurebildung bei Abwesenheit einzelner Vitamine, Purin- und Pyrimidinverbindungen in einer halbsynthetischen Nährlösung in Prozent an. Diese Art der Darstellung wurde gewählt, da die einzelnen Bakterienstämme in den synthetischen und halbsynthetischen Nährlösungen sehr unterschiedlich wachsen (siehe Tab.2), so daß die absoluten Wachstumswerte nicht vergleichbar sind. Die leichter herzustellende, halbsynthetische Nährlösung unterscheidet sich von der synthetischen Nährlösung lediglich dadurch, daß die Aminosäuren außer Tryptophan, Tyrosin und Cystein durch 80 ml vitaminfreies Caseinhydrolysat je Liter (MÜCKE 1955) ersetzt worden sind. Bei der Interpretation dieser Versuchsergebnisse muß vor allem berücksichtigt werden, daß zwar zur Herstellung der Medien nur die reinsten im Handel befindlichen Substanzen, diese aber ohne weitere Reinigung durch Umkristallisation verwendet wurden. Daher können nur die eindeutig negativen Ergebnisse, also Hemmung des Wachstums und der Säurebildung und Ausbleiben des Äpfelsäureabbaus als sicher angesehen werden. Außerdem wurden die Bakterien etwa 14 Tage lang bei 23° kultiviert, also ungewöhnlich lange, und bei sehr niedriger Temperatur. Lange Kulturdauer kann bei Mikroorganismen zur langsamen Synthese der essentiellen Stoffe führen und bei niedriger Temperatur ist der Wuchsstoffbedarf von Mikroorganismen geringer als bei höheren Temperaturen (BOREK u. WAELSCH 1951). Diese Kulturbedingungen wurden jedoch in Analogie zu den Verhältnissen gewählt, die etwa während des biologischen Säureabbaus im Wein nach der Gärung herrschen. (Die normale Temperatur eines Weinkellers liegt allerdings noch niedriger.) Die besonderen, ungewöhnlichen Kulturbedingungen sind sicher die Ursache dafür, daß der Vergleichsstamm *L. plantarum* beim Fehlen aller geprüften Verbindungen einen Äpfelsäureabbau durchzuführen vermag; lediglich durch das Fehlen von Nicotinsäure und Biotin, die für diesen Organismus essentiell sind, werden Wachstum und Säurebildung stärker gehemmt. Für die aus Wein isolierten Bakterien

Tabelle 4. *Der Vitaminbedarf von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien für Wachstum, Säurebildung und Äpfelsäureabbau*
Messungen nach etwa 14 tägiger Kultur der Bakterien in halbsynthetischer Nährlösung (vgl. S. 7) bei 23°C, bei Weglassung von Vitaminen und anderen Wuchsstoffen. Angaben über das Wachstum der Bakterien in der vollständigen, halbsynthetischen Nährlösung enthält Tab. 2, S. 5

Fehlendes Vitamin	<i>L. plantarum</i>			Stamm 2 L			Stamm 12 a			Stamm 16 a			Stamm 45 b		
	% Hemmung von		Äpfelsäureabbau ¹	% Hemmung von		Äpfelsäureabbau	% Hemmung von		Äpfelsäureabbau	% Hemmung von		Äpfelsäureabbau	% Hemmung von		Äpfelsäureabbau
	Wachstum	Säurebildung		Wachstum	Säurebildung		Wachstum	Säurebildung		Wachstum	Säurebildung		Wachstum	Säurebildung	
keins	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+	0		+
Folsäure	15	34	+	98	73	—	77	100	—	94	100	—	99		—
Nicotinsäure und Nicotinsäureamid .	90	91	(+)	71	70	(+)	81	100	—	100	100	—	33		—
Riboflavin	<5	<5	+	98	70	—	77	33	+	22	10	+	66		+
Biotin	50	19	+	38	9	+	28	11	+	61	20	(+)	56		+
Pantothersäure . . .	15	<5	+	47	23	—	42	33	+	83	100	(+)	44		+
p-Aminobenzoesäure .	<5	<5	+	20	19	+	<5	22	+	<5	<5	+	<5		+
Pyridoxin, Pyridoxamin	<5	<5	+	32	12	+	<5	<5	+	<5	<5	+	<5		+
Inosit	15	<5	+	<5	<5	+	<5	<5	+	<5	<5	+	<5		+
Xanthin	<5	<5	+	20	19	+	14	<5	+	<5	<5	+	<5		+
Adenin, Guanin, Uracil	<5	<5	+	20	23	+	<5	11	+	<5	<5	+	<5		+
Orotsäure	<5	<5	+	<5	7	+	<5	<5	+	<5	<5	+	<5		+
Glutamin	<5	<5	+	<5	12	+	<5	<5	+	<5	<5	+	<5		+

¹ + = Äpfelsäure vollständig abgebaut. (+) = Äpfelsäure unvollständig abgebaut. — = kein Äpfelsäureabbau nachweisbar.

Tabelle 5. Der Aminosäurebedarf von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien für Wachstum, Säurebildung und Äpfelsäureabbau in synthetischer Nährlösung (siehe Tab. 1, S. 4) bei Weglassung einzelner Aminosäuren

Messungen nach etwa 14-tägiger Kultur bei 23°C. Angaben über das Wachstum der Bakterien in der vollständigen, synthetischen Nährlösung enthält Tab. 2, S. 5

Fehlende Aminosäure	<i>L. plantarum</i>			Stamm 2 L			Stamm 12 a			Stamm 45 b	
	% Hemmung von		Äpfel-säure-abbau	% Hemmung von		Äpfel-säure-abbau	% Hemmung von		Äpfel-säure-abbau	% Hemmung des Wachstums	Äpfel-säure-abbau
	Wachstum	Säure-bildung		Wachstum	Säure-bildung		Wachstum	Säure-bildung			
keine.	0	0	+ ¹	0	0	+	0	0	+	0	+
D, L- α -Alanin	<5	<5	+	5	<5	+	<5	<5	+	<5	+
D, L- α -Aminobuttersäure	9	<5	+	11	<5	+	<5	<5	+	n. b.	
D, L- γ -Aminobuttersäure	<5	<5	+	5	<5	+	<5	<5	+	n. b.	
L-Arginin	7	<5	+	95	100	+	95	100	+	87	
L-Asparagin	<5	<5	+	11	<5	+	<5	<5	+	n. b.	
L-Asparaginsäure	<5	<5	+	5	<5	+	<5	<5	+	<5	
L-Cystin/Cystein	70	41	+	95	100	+	53	100	(+)	n. b.	
L-Glutaminsäure	100	97	—	97	100	—	93	100	—	91	
Glykokoll	22	<5	+	32	22	+	<5	<5	+	n. b.	
L-Histidin	<5	<5	+	92	100	+	86	100	+	87	
D, L-Isoleucin	57	<5	+	5	8	+	<5	<5	+	5	
D, L-Leucin	100	97	—	95	96	—	95	100	—	91	
L-Lysin	<5	<5	+	<5	<5	+	53	60	+	n. b.	
D, L-Methionin	<5	<5	+	5	<5	+	<5	<5	+	5	
L-Oxyprolin	<5	<5	+	37	<5	+	<5	<5	+	n. b.	
D, L-Phenylalanin	57	<5	+	87	100	—	98	100	—	96	
L-Prolin	13	<5	+	5	<5	+	<5	<5	+	n. b.	
D, L-Serin	<5	<5	+	92	100	+	<5	<5	+	91	
D, L-Threonin	<5	<5	+	<5	<5	+	<5	<5	+	<5	
L-Tryptophan	52	20	+	95	100	—	81	100	—	n. b.	
L-Tyrosin	26	10	+	79	100	—	81	100	—	n. b.	
D, L-Valin	100	97	—	90	100	—	95	100	—	91	

1 + = Äpfelsäure vollständig abgebaut. (+) = Äpfelsäure unvollständig abgebaut.

n. b. = nicht bestimmt. — = kein Äpfelsäureabbau nachweisbar.

erscheint charakteristisch, daß sie zum Abbau der L-Äpfelsäure Folsäure und Nicotinsäure unbedingt benötigen. Die Stämme 2L und 16a benötigen außerdem Pantothersäure, Stamm 2L Riboflavin und Stamm 16a Biotin. Wachstum und Säurebildung der aus Wein isolierten Bakterienstämme werden übereinstimmend durch die Abwesenheit von Folsäure, Nicotinsäure, Riboflavin, Biotin und Pantothersäure stärker gehemmt. Die Bedeutung der übrigen geprüften Verbindungen erscheint dagegen bei dieser Versuchsanstellung gering.

Den Aminosäurebedarf der säureabbauenden Bakterien in synthetischer Nährlösung zeigt Tab.5, S.9. Für die Interpretation der Ergebnisse gilt das schon für Tab.4 Gesagte. Als sicher können nur die negativen Resultate angesehen werden; Wachstum, Säurebildung und Äpfelsäureabbau können durch Verunreinigung der Reagentien vorgetäuscht werden. Es darf daher auch hier nicht überraschen, wenn der Vergleichsstamm *L. plantarum* durch das Fehlen einiger für diesen Organismus essentiellen Verbindungen, z. B. Leucin, nur gehemmt wird, ohne daß der Äpfelsäureabbau unterbleibt. Soweit die aus Wein isolierten Bakterien untersucht wurden, verhalten sie sich in ihren Aminosäureansprüchen recht einheitlich. Für alle diese Stämme scheint die Gegenwart von Arginin, Cystin-Cystein, Glutaminsäure, Histidin, Leucin, Phenylalanin, Serin, Tryptophan, Tyrosin und Valin zum Wachstum, zur Säurebildung und für den Äpfelsäureabbau unumgänglich notwendig zu sein. Es wurde jedoch nicht geprüft, ob die Bakterien in einem Minimalmedium wachsen können, das nur die unbedingt notwendigen Stoffe enthält, da es für Versuche mit Milchsäurebakterien eine Erfahrungstatsache ist, daß die im Auslassungstest als unbedingt erforderlich festgestellten Substanzen allein nicht genügen, um das Wachstum der Bakterien zu ermöglichen. Im Auslassungstest unwirksam erscheinende Verbindungen üben häufig eine geringe Wachstumsförderung aus, die erst bemerkbar wird, wenn mehrere dieser Stoffe in der Nährlösung fehlen.

Die durch Kultur der säureabbauenden Bakterien in synthetischen Nährlösungen gewonnenen Vorstellungen über deren Bedarf an Aminosäuren konnten durch Analyse von Bakterien, die in Traubenmost gewachsen waren, ergänzt werden. Es war anzunehmen, daß die Aminosäuren, die von den Bakterien zum Wachstum benötigt werden (Tab.5), in den Bakterienzellen unverändert als Eiweißbestandteil vorkommen.

In 700 ml sterilfiltriertem Traubenmost (pH-Wert 3,15; Gesamtsäuregehalt, berechnet als Weinsäure 12,9⁰/₁₀₀; Äpfelsäuregehalt 7,4⁰/₁₀₀) wurde Stamm 12a bei 23° kultiviert. Nach 14 Tagen war die Äpfelsäure vollständig abgebaut und es konnten 70 mg = 0,1 mg je Milliliter Bakterientrockenmasse gewonnen werden. Nach mehrmaligem Waschen in dest. Wasser wurden die Bakterien 24 Std in 6 n HCl

hydrolysiert und die Aminosäurezusammensetzung papierchromatographisch untersucht.

In den Bakterienzellen konnten sicher nachgewiesen werden: α -Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin, Leucin und (oder) Isoleucin (nicht getrennt), Methionin und (oder) Valin (nicht getrennt), Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin und Tyrosin; der Nachweis von Cystin-Cystein, Glykokoll und Oxyprolin war nicht völlig sicher. Ein Vergleich des Aminosäuregehaltes der in Traubenmost gewachsenen Bakterien mit deren Bedarf an Aminosäuren zum Wachstum in synthetischer Nährlösung (Tab. 5) zeigt, daß alle von den Bakterien benötigten Aminosäuren — außer Tryptophan, das bei der Hydrolyse zerstört wird — in den Zellen nachgewiesen werden können. Die Aminosäurezusammensetzung der in Traubenmost gewachsenen Bakterien zeigt also eine gute Übereinstimmung mit deren in synthetischer Nährlösung nachgewiesenem Aminosäurebedarf. Es ist daher recht wahrscheinlich, daß die Bakterien beim Wachstum im Most die gleichen Stoffe benötigen, wie beim Wachstum in synthetischer Nährlösung. Einige Aminosäuren kommen in den Bakterienzellen vor, die sich im Auslassungstest als unwirksam erwiesen hatten: Alanin, Asparaginsäure, Glykokoll, Oxyprolin, Prolin und Threonin. Diese Aminosäuren können möglicherweise von den Bakterien in synthetischer Nährlösung selbst synthetisiert werden, falls der Nachweis des Bedarfs an diesen Verbindungen nicht durch Verunreinigungen in den verwendeten Reagentien verhindert wurde. Leider konnte nicht untersucht werden, welche Aminosäuren von den Bakterien aus Traubenmost aufgenommen werden, da im Most keine genügend genauen Aminosäurebestimmungen durchgeführt werden konnten.

Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche konnte gezeigt werden, daß die Nähr- und Wuchsstoffe, die von den Bakterien des biologischen Säureabbaus unbedingt benötigt werden, in der Regel im Most und Wein in genügender Konzentration vorhanden sind. Es ist daher nicht zu erwarten, daß der biologische Säureabbau infolge eines Nährstoffmangels für die Bakterien ausbleibt. Es müssen also andere Faktoren im Most oder Wein die Entwicklung der Bakterien und damit den Abbau der Äpfelsäure beeinträchtigen.

In Modellversuchen wurde daher die Wirkung der Faktoren auf das Wachstum der säureabbauenden Bakterien untersucht, in denen sich Most und Wein am auffälligsten von der oben beschriebenen synthetischen Nährlösung (Tab. 1) unterscheiden: Zuckerkonzentration, Alkoholkonzentration, p_H -Wert, Gehalt an Weinsäure-Anion und SO_2 -Gehalt. — Da diese Versuche wegen ihrer möglichen Bedeutung für die praktische Kellerwirtschaft an anderer Stelle¹ eingehend dargestellt werden sollen, seien hier lediglich die Ergebnisse zusammengefaßt.

¹ Vitis (Landau), in Vorbereitung.

Die aus Wein isolierten säureabbauenden Bakterien wurden bei 23° in entsprechend veränderter Tomatensaftlösung kultiviert. Nach etwa 10 Tagen wurde das Wachstum der Bakterien durch Trübungsmessung bestimmt. Die Versuche ergaben, daß Zuckerkonzentrationen bis zu 30% und ebenso der Gehalt an Weinsäureanion bis zu einer Konzentration von 20‰ (bei konstantem p_H -Wert) ohne wesentlichen Einfluß auf das Wachstum der Bakterien waren. Dagegen wurde das Wachstum der säureabbauenden Bakterien durch einen Gehalt von 10 Vol.-% Äthylalkohol bereits stark gehemmt und durch 18 Vol.-% Alkohol vollständig unterbunden. Der p_H -Wert ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung; unterhalb von p_H 3,1—3,0 erfolgt innerhalb von etwa 10 Tagen kein Wachstum der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. Schweflige Säure, die Most und Wein bei der Kellerbehandlung zugesetzt wird, hemmt in einer Konzentration von 80 mg SO_2 je Liter bereits sehr stark und bei einer Konzentration von 160 mg SO_2 je Liter die Entwicklung der Bakterien und damit den Abbau der L-Äpfelsäure völlig. Der Einfluß der Temperatur wurde nicht untersucht; es ist bekannt, daß der biologische Säureabbau unterhalb von etwa 12° sehr verzögert wird. — Auf Grund dieser Versuche kann festgestellt werden, daß der durch Bakterien verursachte biologische Säureabbau im Wein bei einem p_H -Wert von weniger als 3,1 bis 3,0, einer Alkoholkonzentration von mehr als 10 Vol.-% und einem Gehalt von mehr als 100 mg SO_2 je Liter nicht erfolgen kann, da diese Faktoren, die sich in ihrer Wirkung summieren dürften, das Wachstum der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien sehr stark hemmen oder sogar vollständig verhindern.

Diskussion

Durch die Kultur der Erreger des biologischen Säureabbaus im Wein in einer chemisch definierten Nährlösung wurde die Untersuchung des Nährstoffbedarfs dieser Bakterien ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, daß die Bakterien in einer Nährlösung wachsen können, die aus relativ einfachen, bekannten Verbindungen aufgebaut ist. Es ist somit nicht erforderlich anzunehmen, daß die Äpfelsäure-abbauenden Bakterien für ihre Entwicklung im Most oder Wein auf das Vorhandensein unbekannter Biokatalysatoren angewiesen sind (K. RIPPEL 1942, 1950); die Bakterien benötigen zum Wachstum nur Vitamine, die bekannt sind.

Durch die Versuche wurde ebenfalls bewiesen, daß die säureabbauenden Bakterien keine Eiweißverbindungen zum Wachstum benötigen. Die Bakterien wachsen in völlig eiweißfreien Medien und es ist sehr zweifelhaft, ob sie überhaupt Eiweiß zum Wachstum verwerten können. Freie Aminosäuren werden dagegen von den Bakterien zum Wachstum benötigt. Somit werden die Vorstellungen von SCHANDERL (1950) bestätigt, wonach für die Entwicklung der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien

organische Stickstoffverbindungen erforderlich sind. Allerdings verwerten die Bakterien die Aminosäuren nicht für den Energiestoffwechsel, sondern für den Baustoffwechsel, wie später gezeigt werden soll. LÜTHI u. VETSCH (1953) haben nachgewiesen, daß von dem Äpfelsäure-abbauenden Bakterium (*Bacterium gracile*) vor allem Alanin aus Wein aufgenommen wird. In dem hier beschriebenen Auslassungstest hatte das Fehlen von Alanin keinen Einfluß auf das Bakterienwachstum, was jedoch keineswegs ausschließt, daß die Bakterien Alanin aus dem Traubenmost aufnehmen, zumal ihre Trockensubstanz erhebliche Mengen von Alanin enthält. JERCHEL u. Mitarb. (1956) haben an Stämmen von *Bacterium gracile* nachweisen können, daß Pantothensäure, Riboflavin und Inosit zum Teil die Säurebildung fördern, und daß Alanin, Serin, Glykokoll, Threonin, Glutaminsäure, Prolin, Arginin, Asparaginsäure und γ -Aminobuttersäure von den Bakterien in komplexen Nährlösungen umgesetzt werden können. Mit den hier dargestellten Ergebnissen stimmen diese Beobachtungen gut überein, obwohl sie in komplexen Nährmedien mit anderen Bakterienstämmen erhalten wurden.

Die hier beschriebenen Versuche machen die Annahme eines Metabioseverhältnisses zwischen Weinhefen und säureabbauenden Bakterien (vgl. SCHANDERL 1950) unnötig, ebenso widerlegen sie die weitverbreitete Ansicht, daß die Gegenwart der Trubstoffe für die Entwicklung der Bakterien erforderlich ist. Die säureabbauenden Bakterien können in klarem, sterilfiltrierten Traubenmost gezüchtet werden, in dem noch keine Hefen gewachsen waren. (Die Trubstoffe könnten allenfalls das Wachstum der Bakterien durch Verzögerung des Absinkens ein wenig fördern.) Beim normalen Weinausbau werden sich jedoch zweifellos Beziehungen zwischen dem Stoffwechsel der Hefen und der säureabbauenden Bakterien ergeben. So wird z. B. von der Weinhefe das an sich schon im Traubenmost vorkommende Riboflavin gebildet (CASTOR 1953, LAFOURCADE u. PEYNAUD 1957), das andererseits ein essentieller Wachstoffsstoff für das säureabbauende Bakterium Stamm 2L ist. Sicher können auch Aminosäuren, die aus Hefezellen bei der Autolyse frei werden, von den Bakterien als Nährstoffe verwendet werden. Voraussetzung für die Entwicklung der Bakterien sind diese Vorgänge jedoch nicht. Denkbar, wenn auch wenig wahrscheinlich, ist lediglich ein negativer Einfluß der Hefe auf das Bakterienwachstum. Es wäre möglich, daß die Hefen vorübergehend einzelne essentielle Aminosäuren so intensiv aufnehmen, daß der im Traubenmost verbleibende Rest für die Entwicklung der säureabbauenden Bakterien nicht mehr ausreicht. Die von den Bakterien benötigte Menge an einzelnen Aminosäuren ist jedoch äußerst gering. Zum vollständigen Abbau der L-Äpfelsäure in 1 Liter Traubenmost ist die Entwicklung von etwa 50 mg Bakterienmasse erforderlich. Bei der Annahme, daß die Bakterienmasse zu 80% aus Eiweiß besteht, genügen also,

insgesamt etwa 40 mg Aminosäuren zur Entwicklung der Bakterien. Da die Bakterien aus etwa 17 Aminosäuren bestehen, sind also je Aminosäure nur 1—5 mg je Liter Most oder Wein für das Wachstum der Bakterien notwendig.

Als Energiequelle dienen den säureabbauenden Bakterien Kohlenhydrate, worauf in einer späteren Veröffentlichung näher eingegangen werden soll.

Die Ursache für den gewöhnlich erst nach der Gärung erfolgenden Ablauf des „biologischen Säureabbaus“ ist die im Vergleich zu den Hefen geringe Wachstumsgeschwindigkeit der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. Das langsame Wachstum der Bakterien ist wiederum eine Folge der für die Bakterien wenig günstigen Bedingungen im Traubenmost oder Wein (niedriger p_H -Wert, Alkoholgehalt, SO_2 -Gehalt) und die meist niedrige Kellertemperatur. Die aufgezählten Faktoren können die Entwicklung der Bakterien und damit den biologischen Säureabbau völlig verhindern.

Zusammenfassung

Vier aus Wein isolierte Milchsäurebakterien, die darin die Decarboxylierung der L-Äpfelsäure zu Milchsäure und Kohlensäure, also den sogenannten biologischen Säureabbau verursachen, wurden in einer Nährlösung mit chemisch definierter Zusammensetzung gezüchtet. Diese Nährlösung enthielt 22 Aminosäuren, Kohlenhydrat, die Vitamine der B-Gruppe, Purin- und Pyrimidinverbindungen, Carbonsäuren und Mineralsalze. Im Auslassungstest wurde untersucht, welche Stoffe der synthetischen Nährlösung für die Entwicklung der Bakterien unbedingt erforderlich sind. Von den geprüften Verbindungen hemmte das Fehlen von Folsäure, Nicotinsäure, Riboflavin, Biotin, Pantothersäure, Arginin, Cystin-Cystein, Glutaminsäure, Histidin, Leucin, Phenylalanin, Serin, Tryptophan, Tyrosin oder Valin das Wachstum, die Säurebildung und den Äpfelsäureabbau bei allen oder einzelnen der vier aus Wein isolierten, säureabbauenden Bakterien.

Ein Vergleich der Zusammensetzung der synthetischen Nährlösung mit der Zusammensetzung von Most oder Wein zeigte, daß im Most oder Wein normalerweise die zur Entwicklung der säureabbauenden Bakterien erforderlichen Nähr- und Wuchsstoffe in ausreichender Konzentration vorhanden sind. — Für die Entwicklung der säureabbauenden Bakterien sind ungünstig: niedriger p_H -Wert, hoher Alkohol- oder SO_2 -Gehalt, sowie niedrige Temperatur. Diese Faktoren vermögen das Wachstum der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien und damit den biologischen Säureabbau vollständig zu verhindern.

Herrn Prof. Dr. B. HUSFELD bin ich für die Förderung meiner Arbeiten zu Dank verpflichtet.

Literatur

BARTON-WRIGHT, E. C.: The microbiological assay of the vitamin B complex and amino acids. London 1952. — BRIDAN, P.: Sur quelques bactéries isolées des vins en fermentation malolactique. *Ann. Technol.* **4**, 597—617 (1956). — BOREK, E., and H. WAELSCH: The effect of temperature on the nutritional requirement of micro-organisms. *J. biol. Chem.* **190**, 191—196 (1951).

CASTOR, J. G. B.: *Food Res.* **18**, 139—159 (1952): zit. nach PRILLINGER, F.: Über die stickstoffhaltigen Substanzen im Wein. *Mitt. Klosterneuburg 7 A*, 138 bis 147 (1957). — The B-complex vitamins of musts and wines as microbial growth factors. *Appl. Microbiol.* **1**, 97—102 (1953).

FORNACHON, J. C. M.: The occurrence of malo-lactic fermentation in Australian wines. *Australian J. Appl. Sci.* **8**, 120—129 (1957).

HALL, A. P., L. BRINNER, M. A. AMERINE and A. F. MORGAN: The B vitamin content of grapes, musts, and wines. *Food Res.* **21**, 362—71 (1956).

JERCHEL, D., P. FLESCH u. E. BAUER: Untersuchungen zum Abbau der L-Äpfelsäure durch *Bacterium gracile*. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **601**, 40—60 (1956).

KOSER, S. A., and J. L. THOMAS: Amino acid requirements of oral lactobacilli. *J. infect. Dis.* **97**, 287—298 (1955).

LAFOURCADE, S., et E. PEYNAUD: Sur la teneur des vins en riboflavine. *Rev. Ferment. Ind. aliment.* **12**, 9—14 (1957). — LÜTHI, H.: La rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres. *Rev. Ferment. Ind. aliment.* **12**, 15—21 (1957). — LÜTHI, H., u. U. VETSCH: Papierchromatographische Trennung und Bestimmung von Aminosäuren in Traubenmost und Wein. *Der Dtsche. Weinbau. Wiss. Beihefte* **7**, 3, 33—54 (1953).

MÜCKE, D.: Einführung in mikrobiologische Bestimmungsverfahren. Leipzig 1955. — MÜLLER-THURGAU, H., u. A. OSTERWALDER: Die Bakterien im Wein und Obstwein. Jena 1913.

OCHOA, S.: Enzymatic mechanisms of carbon dioxide fixation. In: SUMNER, J. B., and K. MYRBÄCK: *The Enzymes*. New York 1952. Bd. II, S. 929—1032.

PEYNAUD, E., et S. LAFOURCADE: Sur la présence de vitamine B₁₂ dans les vins. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **241**, 127—129 (1955a). — L'inositol dans les raisins et dans les vins. Son dosage microbiologique. *Ann. Technol.* **4**, 381—396 (1955b).

RADLER, F.: Untersuchungen über den Gehalt der Moste einiger Rebensorten und -arten an den Vitaminen Pyridoxin, Pantothenensäure, Nicotinsäure und Biotin. *Vitis (Landau)* **1**, 96—108 (1957); *Experientia (Basel)* **13**, 318 (1957). — Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. Isolierung und Charakterisierung von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **30**, 64—72 (1958). — RRPPEL, K.: Der bakterielle Abbau der Äpfelsäure im Wein als Folge biologisch aktiver Wirkstoffe (Biokatalysatoren) in den Weinbeeren. *Ber. dtsch. bot. Ges.* **60**, 108 bis 117 (1942). — Der biologische Säureabbau im Wein. *Arch. Mikrobiol.* **14**, 509—530 (1950).

SCHANDERL, H.: *Die Mikrobiologie des Weines*. Stuttgart 1950.

WURZIGER, J.: Über den Mangan Gehalt im Wein. *Dtsch. Wein-Zeitung* **90**, 364 (1954).

(Chemistry Department of Allahabad University and
Agriculture College, Jabalpur, India)

Study of 2,3-Butanediol Formation by *Serratia marcescens*

By

K. BAHADUR and J. N. DUBE

(Eingegangen am 14. Mai 1958)

Out of the various micro-organisms capable of fermenting carbohydrate material to 2, 3-butanediol formation *Serratia marcescens* has drawn a good deal of attention (PRESCOTT and DUNN 1949). It is a gram negative bacteria capable of producing trimethylamine and fermenting sucrose to 2, 3 butanediol. It is known to contain three enzymes, aspartase, nitrate-reductase and peptidase, of which aspartase deaminizes aspartic acid and nitrate reductase (WOOLF 1929) converts nitrate into nitrogen. This organism takes part in the denitrification also. The peptidase of the organism is activated by Mg^{++} and is specific leucine aminopolypeptidase (AUBEL 1938) whose activity is comparable with the similar enzyme isolated from animal sources.

Experimental

The medium of the following composition was prepared as the basic substrate for the fermentation studies: $KH_2PO_4 = 0.15$ g; $K_2HPO_4 = 0.35$ g; $(NH_4)_2SO_4 = 0.17$ g; $MgSO_4 = 0.08$ g; $H_2O = 100$ ml.

To this culture medium different quantities of phosphate, sucrose and calcium carbonate as described in the tables were added for the investigation of their influence. In the basic substrate containing 0.292% phosphate in the form of KH_2PO_4 and K_2HPO_4 the quantities of individual phosphates were changed so as to give 0.146%, 0.438%, 0.584% phosphate and then the pH of each medium was adjusted to 7. For the investigation of the influence of pH similar culture media as described above were used and the initial pH of each culture medium was adjusted as mentioned in the table, using the Lovibond comparator for determination of pH .

Culture media were sterilized at 15 lbs. pressure for 30 min. in autoclave. On cooling they were seeded with a trace of *Serratia marcescens* (also known as *Bacterium prodigiosum* and *Chromobacterium prodigiosum*). The strain was obtained from U. S. D. A. Agricultural Research Service, Northern Utilisation Branch, Peoria, Illinois, USA. The identification was carried and purity checked in the Department of Bacteriology, Veterinary College, Jabalpur. The flasks were kept at 35° C. in an incubator for fermentation. The cultures were analysed after 20 days.

The determination of 2, 3-butanediol was carried according to the method given by MOUREN and DODE (1934). 10 cc. of the fermented solution were placed in a bulb tube and 20 cc. of saturated bromine water were added to it. The tube was sealed and placed in boiling water for three minutes. The excess of bromine was removed by the addition of 20% Na_2SO_3 . The mixture was transferred to a 150 cc. distillation flask and 15 cc. of 45° Be solution of $FeCl_3$ were added to it and distilled into the mixture of 10 cc. of 20% hydroxylamine hydrochloride, 10 cc. of 20% sodium

Table 1. *Effect of concentration of phosphate; formation of 2,3-butanediol by Serratia marcescens (pH = 7)*

Gms. of PO ₄ in the culture	Reducing sugar in gms.	Total sugar left in gms.	Sugar consumed in gms.	Alkali meq.	gms. of 2,3-butanediol formed	% of 2, 3-butanediol on the basis of sugar consumed
0.146	0.200	1.846	1.154	0.936	—	—
0.292	0.282	1.846	1.154	0.840	0.356	30.84
0.438	0.246	1.710	1.290	1.140	0.255	19.72
0.584	0.333	1.412	1.588	0.726	—	—

Table 2. *Influence of calcium carbonate on the formation of 2,3-butanediol by Serratia marcescens (pH = 7)*

Gms. of CaCO ₃	Reducing sugar in gms.	Total sugar left in gms.	Sugar consumed in gms.	Alkali meq.	2, 3-butanediol gms.	% of 2, 3-butanediol formed on the basis of sugar consumed
0.0	0.282	1.846	1.154	0.840	0.356	30.84
1.00	0.087	0.214	2.796	1.830	0.799	27.86
2.00	0.270	0.248	2.652	2.280	0.713	26.90
3.0	<0.024	<0.024	3.000	1.570	0.502	16.73

Table 3. *Influence of hydrogen ion concentration on the formation of 2,3-butanediol in the cultures of Serratia marcescens*

pH of the culture	Reducing sugar in gms.	Total sugar left in gms.	Gms. of sugar consumed	Alkali meq.	2, 3-butanediol in gms.	% of 2, 3-butanediol formed on the basis of sugar consumed
5	0.300	2.400	0.600	0.366	0.197	12.31
5.5	0.024	1.100	1.900	0.216	0.458	24.10
6.5	0.024	0.889	2.111	0.096	0.437	20.70
7.0	0.282	1.846	1.154	0.840	0.356	30.84
8.0	0.686	0.960	2.040	0.180	0.272	13.43
9.0	0.462	1.143	2.857	0.108	0.277	14.90

Table 4. *Effect of concentration of sucrose on the formation of 2,3-butanediol by Serratia marcescens (pH = 7)*

Gms. of Sucrose in the culture	Reducing sugar in gms.	Total sugar in gms.	Sugar consumed in gms.	Alkali meq.	2, 3-butanediol formed in gms.	% of 2, 3-butanediol calculated on the basis of sugar consumed
1.50	0.165	1.000	0.500	0.078	0.790	38.00
3.00	0.282	1.846	0.154	0.840	0.356	30.84
4.5	0.242	2.400	2.100	0.048	0.116	5.52
7.5	1.000	4.800	2.700	0.030	0.233	8.63

acetate and 10 cc. of 10% nickel chloride. The distillate was heated for 1 to 2 hours on the water bath and the nickel salt of dimethylglyoxime was filtered, dried at 100° C and weighed. The weight of the glyoxime salt was multiplied by the conversion factor 0.824 which gave the amount of 2,3-butanediol.

Result obtained by the analysis of the different sets are tabulated in the Tables 1 to 4. All the results given in the tables is in 100 cc of the culture.

Discussion

The above results indicate that in most of the cultures the solution becomes alkaline after the fermentation. Maximum formation of 2,3-butanediol takes place in the culture containing 0.292 gm of phosphate. In cultures containing high concentration or very low concentration of phosphate the formation of the diol is inhibited. Study of the influence of calcium carbonate on the formation of 2,3-butanediol indicates that the presence of a small quantity of calcium carbonate in culture greatly increases the sugar consumption. However, it is interesting to observe that if the concentration of calcium carbonate is further increased in the culture the sugar consumption is not and this increased sugar consumption remains constant. The presence of 1% calcium carbonate in the culture increases the formation of 2,3-butanediol in gms but if the quantity of calcium carbonate is further increased the increase in the concentration of calcium carbonate is followed by decreased formation of the diol. But if the influence of calcium carbonate on the formation of 2,3-butanediol is considered in terms of the percentage yield on the basis of sugar consumed during fermentation it is observed that due to the subsequent increase in the sugar consumption by the organism the yield of 2,3-butanediol gradually decreases with the increase of calcium carbonate in the culture. Thus the cultures containing no calcium carbonate and containing 1%, 2% and 3% of calcium carbonate the percentage yield of diol is 30.84, 27.86, 26.90 and 16.73 respectively.

Study of the influence of hydrogen ion concentration indicates that it has profound influence on the fermentation. The optimum p_H for the formation of the diol in the culture is 7. The p_H values 5, 8 and 9 have been found to be unfavourable for the formation of the diol. Thus the experiment described here indicates that the presence of 0.292% of phosphate ions in the culture gives maximum yield of 2,3-butanediol in the cultures of *Serratia marcescens*. This increase in the formation of the diol is not due to the increased sugar consumption but due to the phosphate activating the enzymic system responsible for the formation of 2,3-butanediol. Small concentration of phosphate remains ineffective in activating enzymic system and high concentration proves poisonous. Calcium carbonate increases the sugar consumption in the cultures of *Serratia marcescens*. If the concentration calcium carbonate in the culture remains only 1% the increased sugar consumption is followed by increased formation of 2,3-butanediol in terms of diol formed in the culture. But the sugar consumption is so much increased that even with this increased formation of the diol percentage yield of the diol calculated

on the basis of sugar consumed during the fermentation remains lower than the cultures containing no calcium carbonate. Thus it appears that though calcium carbonate activates the enzymic reaction leading to the formation of 2,3-butanediol it also activates some side reactions and considerable sugar is consumed in this side enzymic reaction too.

The optimum p_H value of the culture for the formation of 2,3-butanediol is 7 and at this p_H value considerably low sugar consumption is observed.

Summary

Serratia marcescens can be used for the fermentation of sugar for the formation of 2,3-butanediol. Presence of 1% calcium carbonate increases the formation of the diol and 0.292% of phosphate gives the maximum percentage yield of the diol. The optimum p_H for the formation of the diol has been found to be 7.

Acknowledgement

I am highly thankful to Dr. R. L. GUPTA, Principal College of Agriculture, Jabalpur, for giving laboratory facilities and also to Shri. U. R. K. RAO of the Department of Bacteriology, Veterinary College, Jabalpur, for his valuable help.

References

- AUBEL, E.: C. R. Soc. Biol. (Paris) **128**, 45 (1938).
MOUREN, H., and M. DODE: Bul. Assoc. Chem. Sucr. Dist. **512**, 47 (1934).
PRESCOTT, S. C., and C. G. DUNN: Industrial Microbiology, Second Edition, McGraw Hill Book Company, Inc. 488 (1949).
WOOLF: Biochem. J. **23**, 472 (1929).

(Aus dem Institut für landwirtschaftliches Versuchs- und Untersuchungswesen
Jena-Zwätzen der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin)

2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumsals als Hilfsmittel bei der Keimzählung nach dem Kochschen Gußplatten-Verfahren

Von
H. UNGER

(Eingegangen am 30. Mai 1958)

Eine Veröffentlichung von BUCKSTEEG u. THIELE (1958) gibt Veranlassung, eigene Erfahrungen zu dem dort aufgeworfenen Problem der Verwendung von 2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (TTC) beim Gußplattenverfahren mitzuteilen. Genannte Verfasser beschreiben die bei der Keimzähltechnik bestehenden Schwierigkeiten und die Anwendung des TTC für Gelatinenährböden. Sie berichten über ihre Erfahrungen mit dem Reduktionsmittel in der Wasserbakteriologie und schlagen die allgemeine Einführung dieser Methode in die bakteriologische Wasseruntersuchung vor. Dieser Vorschlag kann nach unseren Erfahrungen ganz allgemein auf das Gußplattenverfahren ausgedehnt werden.

Wir arbeiten im Bodenbakteriologischen Labor unseres Institutes mit diesem Reduktionsmittel bereits seit 2 Jahren zur Erleichterung des Auszählens der auf Fleischwasser-Pepton-Agar gewachsenen Kolonien und haben dabei besten Erfolg¹). BUCKSTEEG u. THIELE weisen auf die bestehenden Unsicherheitsfaktoren und Fehlermöglichkeiten der bakteriologischen Untersuchungsmethoden und besonders des Gußplattenverfahrens in der Wasserbakteriologie hin. Für die Bodenbakteriologie bestehen annähernd die gleichen Schwierigkeiten. Abgesehen von Fehlern, die bis zum Guß einer Platte auftreten können (Probeentnahme, Aufbereitung der Proben, Herstellung der Bodenlösung und Verdünnungsreihen usw.), sind bei der Auswertung selbst eine Anzahl Fehlerquellen gegeben. So können die in einem Nähragar wachsenden Kolonien in ihrer Größe recht unterschiedlich sein. Das Erkennen kleinster Formen ist meist nur mit Lupe oder Stereomikroskop möglich und das Zählen äußerst zeitraubend wie anstrengend. Im Agar liegende Kolonien werden oft von oberflächlich wachsenden überdeckt. Kleinste organische Reste, Luftbläschen und Bodenteilchen sind nicht immer leicht von gewachsenen Kolonien zu unterscheiden. Auch kommen trotz genauer Einstellung des pH-Wertes und

¹ Die von uns durchgeführten Keimzahlermittlungen auf abwasserbehandelten schweren und leichten Böden laufen im Rahmen eines Forschungsauftrages mit der Kurzfassung: „Landwirtschaftliche Abwasserverwertung“. (Verantwortlicher Bearbeiter: Dr. G. SCHMAUDER).

Filtrierung des Agars schwache Ausflockungen vor, die das Zählen der Platten ungeheuer erschweren. Das schwierigste Problem ist aber das häufige Auftreten schwärmender, überwuchernder Bakterienformen. Der von diesen gebildete dichte Rasen, der oft die ganze Oberfläche bedeckt, verhindert ein Erfassen der im Agar wachsenden Kolonien. Da diese Platten vor der Anwendung des TTC nicht ausgewertet werden konnten, fielen uns häufig ganze Versuchsreihen aus.

Wir versuchten diese Schwierigkeiten zunächst mit verschiedenen Zählmethoden zu umgehen. Die Platten wurden mit dem Stereomikroskop „Cytoplast“ ausgezählt, um auch die kleinsten Kolonien zu erfassen. Da das aber auf die Dauer für den Beobachtenden zu anstrengend ist, benutzten wir wie MÜLLER (1954) das Lesegerät des VEB-Carl Zeiß, Jena, als Projektionsgerät und Hilfsmittel für die Zählung. Diese Methode bringt zwar Erleichterung der Zählerarbeit, ist aber insofern nicht vollkommen, als der Zeitaufwand je Platte zu hoch ist. Auf der Suche nach besserer Sichtbarmachung der Kolonien wurde die Möglichkeit der Verwendung der Tetrazoliumsals erwogen. Die in jüngster Zeit häufig beschriebene Anwendung dieses Reduktionsmittels in der Bakteriologie (WALLHÄUSER u. RIPPEL-BALDES 1950; WALLHÄUSER 1951; STOLP 1952; SCHÖNBERG 1953; STILLE 1952/53 u. 1956; usw.) versprach Erfolg und wir legten 1956 Versuche zur Färbbarkeit von Bodenbakterienkolonien mit TTC an¹. Das TTC wurde anfangs, wie BUCKSTEEG u. THIELE empfehlen, in verschiedenen prozentigen Lösungen und variierten Mengen auf die Oberfläche der bebrüteten Platten gebracht. Da sich bei diesem Verfahren ein Teil der auf der Oberfläche des Agars wachsenden Kolonien nach Zugabe der TTC-Lösung abhob oder auflöste und damit eine Auswertung unmöglich machte, versuchten wir das Aufbringen der TTC-Lösung zu ändern und gingen vom Aufpipettieren zum Aufsprühen über. Obwohl die Reduktionswirkung eindeutig war, lösten sich wiederum Kolonien auf. Ferner bedeutet das Aufbringen des Reduktionsmittels auf die Oberfläche im Routinebetrieb eine zeitliche Mehrbelastung, die es nach Möglichkeit zu vermeiden galt.

Wir versuchten deshalb, das Tetrazoliumsals dem Agar vor dem Plattengießen zuzusetzen und die Bakterien auf dem reduktionsmittelhaltigen Medium zu bebrüten. Die Ergebnisse der mit diesem Versuchsziel angesetzten Versuchsreihen werden im folgenden dargestellt.

TTC-Konzentration und Hemmwirkung. Die in der Literatur oft vermerkte baktericide Wirkung des TTC (PREUNER, v. PRITTWITZ u. GAFFRON 1952; WUNDT 1950; usw.) ließ uns von vornherein mit geringen Konzentrationen arbeiten. So wurden Mengen von 0,01, 0,005 und 0,001% TTC zugesetzt. Die Ergebnisse zeigten eine Abnahme der Hemmwirkung mit sinkender TTC-Konzentration. Im Mittel aller Versuche konnten gegenüber den reduktionsmittelfreien Platten bei

¹ Wir benutzten für unsere Versuche das Triphenyltetrazoliumchlorid des VEB Schering, Berlin-Adlershof, und das 2,3,5-Tetrazoliumsals (für wissenschaftliche Zwecke), ein Tetrazoliumsulfat des Laboratoriums für organische Synthese, Leipzig O 5. Für beide Tetrazoliumsals konnte in den von uns verwendeten Konzentrationen gleiche Wirkung und Färbungsintensität festgestellt werden. Für die Routineuntersuchungen wurde das in unserem Institut für die Keimfähigkeitskontrolle des Saatgutes verwendete Tetrazoliumsulfat freundlicherweise von Herrn Dr. LINDNER zur Verfügung gestellt.

0,01%igem TTC-Zusatz etwa 60%, bei 0,005% etwa 90% und bei 0,001% etwa 100% der aus Bodenaufschwemmungen auf Fleischwasseragar gewachsenen Kolonien erfaßt werden.

Daß bei einem TTC-Gehalt von 0,001% keine Keimhemmung mehr auftritt, stimmt mit den Ergebnissen von WUNDT (1950) völlig überein, der für eine große Anzahl Bakterien die wachstumsbegrenzende TTC-Konzentration ermittelte, die im ungünstigsten Fall (Shiga-Kruse-Ruhr) bei 0,009% lag. Er fand eine sichtbare Formazanbildung bis zu einer Verdünnung von 1:320000. WUNDT schließt aus seinen Versuchsergebnissen, daß bei Einhaltung entsprechender Konzentrationen alle Bakterien TTC-reduktionsfähig sind. Ähnliche Konzentrationen verwenden KELLY u. FULTON (1953) bei ihrem Motilitätstest mit bestem Erfolg. Sie erreichen mit einem Zusatz von 0,006% Triphenyltetrazoliumchlorid zum Nähragar ein gutes Sichtbarwerden beweglicher Bakterien im Hochschichtröhrchen.

Wenn auch bei Zusatz von 0,001% TTC keine Keimhemmung mehr auftritt, so kommt es doch bei einigen Bodenbakterienarten zu einer schwachen Wachstumsverzögerung, die sich bei Beurteilung und Auswertung nach 48stündiger Bebrütung bei 25° C in der geringeren Größe dieser Kolonien gegenüber „ohne TTC“ bemerkbar macht. Diese anfangs schlecht sichtbaren kleinen Kolonien sind bis zum 3. Tag nach der Beimpfung restlos „nachgekommen“. Da wir die Platten auch ohne Reduktionsmittel grundsätzlich frühestens nach 3 Tagen zählen, bedeutet das keinen Nachteil.

Intensität der Färbung. Das zuletzt Gesagte bezieht sich ebenso auf die Intensität der Formazaneinlagerung, die als Rotfärbung sichtbar wird. Die stärkste Färbung wird erst nach 3 Tagen Brutzeit erreicht und ist dann so, daß alle Kolonien gerötet sind. Die einzelnen Bakterienkolonien unterscheiden sich gut in ihren Reduktionszentren. Es kommen Kolonien vor, deren Zentrum die stärksten Formazaneinlagerungen zeigt, während bei anderen der Ort der aktivsten Reduktion am Rand der Kolonie liegt. Sie unterscheiden sich auch in der Intensität der Reduktion. Vom ganz hellen bis zum dunklen Rot sind alle Abstufungen zu beobachten.

pH-Wert. Die von WUNDT für eine rasche Reduktion empfohlene Alkalität des Mediums wird auch von BECKER u. QUADBECK (1950) angegeben. Wir führen die relativ geringe Formazanbildung auf einem Nitritagar auf den niedrigen pH-Wert des Nährmediums zurück. Entsprechende Versuche hierzu wie auch zur Anwendung des TTC-Zusatzes auf anderen Agarnährböden sind in Vorbereitung.

Nach Klärung dieser Fragen und auf Grund der für uns ausschlaggebenden Tatsache, daß die Keimzahlen auf behandelten und unbehandelten Platten im Mittel gut übereinstimmen, führten wir diese Methode für die Vegetationsperiode 1956 in die Untersuchungstechnik ein und hielten sie bis heute bei. Wir verfahren wie folgt:

Es wird aus einer 1%igen TTC-Stammlösung unter Einhaltung steriler Bedingungen eine 0,01%ige Lösung hergestellt. Davon werden auf 900 cm³ gießfertigen flüssigen, auf 50° C abgekühlten Agar 100 cm³ dieser Lösung unter sterilen Kautelen zugesetzt. Der dann 0,001% TTC enthaltende Agar wird in die Petrischalen ausgegossen und mit der Bodensuspension gemischt. Die erkalteten Platten werden 3 Tage bei 25° C bebrütet und auf weißer Unterlage oder gegen das Tageslicht mittels Handlupe ausgezählt.

Dieses Verfahren ergab einige sehr wertvolle Vorteile: 1. Die durch die Formazaneinlagerung hervorgerufene Rotfärbung der Kolonien bei ungefärbtem Nährboden ermöglicht leichtes Erkennen aller gewachsenen, selbst der kleinsten Kolonien. — 2. Die genaue Unterscheidung von Verunreinigungen, Ausfällungen und Bodenteilchen gegenüber Bakterienkulturen ist einfach und eindeutig. — 3. Es wird eine hohe Zählleistung ohne große Anstrengung und Ermüdung des Zählenden erreicht. — 4. Nach der TTC-Behandlung können alle Platten, auch die völlig oder zum Teil überwucherten ausgewertet werden.

Die mit schwärmenden Bakterien überwucherten Platten mußten vor Einführung der Reduktionsmittelanwendung von der Auswertung ausgeschlossen werden. Die Keimzahl dieser Platten war wesentlich geringer als die der nicht überwachsenen. Bisher wurde diese geringere Keimzahl auf eine Hemmwirkung des überwuchernden Bakteriums auf die anderen Arten zurückgeführt. Durch die TTC-Behandlung hat sich jedoch herausgestellt, daß der größte Teil der Bakterienkolonien auf den überwachsenen Platten lediglich nicht erkennbar ist. Nach der Verwendung des TTC wurde eine erstaunlich große Anzahl von Kolonien unter dem Bakterien Schleier sichtbar. Ein Vergleich der Kolonienzahl zwischen überwucherten und nicht überwucherten Platten ergibt jetzt eine verblüffend gute Übereinstimmung.

Zweifellos spielt die Frage des Antagonismus bei Überwucherungen eine bedeutende Rolle. Das kommt besonders darin zum Ausdruck, daß auf einigen überwachsenen Platten trotz Anwendung des Tetrazoliumsalzes die Keimzahl weit unter der des Mittelwertes lag. Diese Fälle waren zwar in den Jahren 1956/57 relativ selten, unterstreichen aber die Notwendigkeit der Beachtung antagonistischer Probleme. Der entscheidende Faktor für das Sichtbarwerden überwuchelter Bakterien scheint der Zeitpunkt des Beginns der Rasenbildung zu sein. Je später das Schwärmen beginnt, um so mehr Zeit zum Wachsen bleibt für die anderen Bakterienarten bis zur eventuell eintretenden Hemmung. Ist diese Zeitspanne lang genug, um die Bildung einer Kolonie zu ermöglichen, wird diese auch nach dem Überwachsen durch die Formazaneinlagerung erkennbar. Da wir bei der Konzentration von 0,001% Tetrazoliumsalz im Fleischwasseragar bei allen überwuchernden Bakterienarten meist nur eine ganz zarte Anfärbung feststellten, wird die gute Auswertbarkeit dieser Platten erklärlich.

Zusammenfassung

In Anlehnung an die Arbeit von BUCKSTEEG u. THIELE (1958), die die Anwendung von TTC bei der Keimzähltechnik in der Wasserbakteriologie empfehlen, wird über die Benutzung dieses Reduktionsmittels bei der Auswertung von Gußplatten in der Bodenbakteriologie berichtet. Im Gegensatz zu den genannten Verfassern wird das Tetrazoliumsals dem verflüssigten Agar zugesetzt und die Bakterien auf dem reduktionsmittelhaltigen Nährsubstrat bebrütet. Zur Vermeidung von Keimhemmungen wird mit einem TTC-Zusatz von 0,001% gearbeitet. Die damit erzielte Rotfärbung ist ausreichend, um ein exaktes Erkennen kleinster und überdeckter Kolonien zu ermöglichen sowie die Unterscheidung von Verunreinigungen und die Zählarbeit wesentlich zu erleichtern und zu verkürzen. Als weiterer Vorteil wird die Auswertbarkeit auch überwucherter Platten festgestellt.

Literatur

- BECKER, H., u. G. QUADBECK: *Naturwissenschaften* **37**, 565 (1950). — BUCKSTEEG, W., u. H. THIELE: *Zbl. Bakt., II. Abt.* **111**, 235—237 (1958). — KELLY, A. T., and M. FULTON: *Amer. J. clin. Path.* **23**, 512 (1953); ref.: *Mikrokosmos*, Heft 10, 240 (1955). — MÜLLER, G.: Die Wechselwirkung zwischen der Anzahl der Bodenmikroorganismen und den Standortsfaktoren bei 24 Futterpflanzenarten. Vorträge aus den Gebieten Acker- und Pflanzenbau, Bodenkunde und Pflanzenzüchtung. Deutscher Verlag der Wissenschaften 67—89 (1954). — PREUNER, R., u. J. v. PRITZWITZ und GAFFRON: *Naturwissenschaften* **39**, 128—131 (1952). — SCHÖNBERG, F.: Die Molkerei-Zeitung, *Welt der Milch* **7**, 1569 (1953). — STILLE, B.: *Zbl. Bakt., II. Abt.* **107**, 250—254 (1952/53). — STILLE, B.: *Arch. Mikrobiol.* **24**, 31—40 (1956). — STOLP, H.: *Arch. Mikrobiol.* **17**, 209—212 (1952). — WALLHÄUSER, K. H., u. A. RIPPEL-BALDES: *Naturwissenschaften* **37**, 450 (1950). — WALLHÄUSER, K. H.: *Naturwissenschaften* **38**, 237 (1951). — WUNDT, W.: *Dtsch. med. Wschr.* **1950**, 1471—1472.

(Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Pisa)

Reisolamento di una rara specie di Lievito:

Trigonopsis variabilis Schachner

ONORATO VERONA e ODETTE ZARDETTO de TOLEDO*

Con 4 figure nel testo

(Eingegangen am 18. Juni 1958)

Nel corso della identificazione di numerosi ceppi di lieviti isolati, nello Stato di S. Paolo in Brasile, da mosto d'uva, si è avuto occasione di rinvenire *Trigonopsis variabilis* Schachner, specie relativamente ben

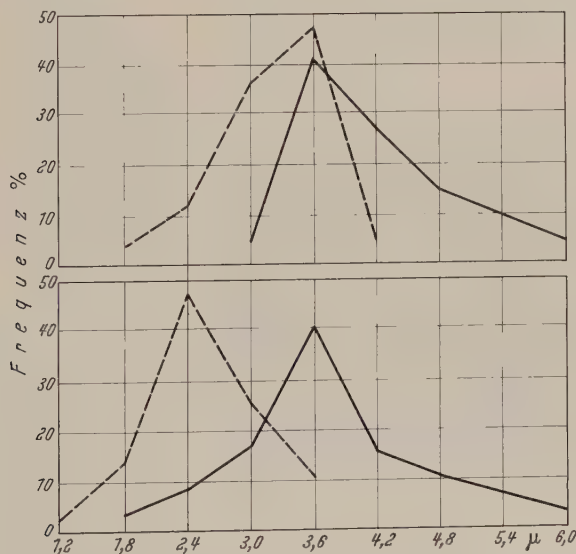


Fig. 1. Dimensioni delle cellule ovali di *Trigonopsis variabilis* in malto (in alto!) ed in agar-malto (in basso!): - - - - - larghezza; — lunghezza

nota, ma senza dubbio assai rara. Di fatto, dopo la prima segnalazione di SCHACHNER (1929) che rinvenne questa interessante specie, nel 1929, in certe birre di Monaco, non ci consta che siano stati eseguiti altri isolamenti.

* dell' Istituto Agronomico di Campinas (S. Paolo, Brasile) e Borsista del Conselho Nacional de Pesquisas del Brasile.

Riteniamo pertanto di una certa importanza questo nostro rinvenimento; se non altro, dal punto di vista ecologico in quanto appaiono nuovi sia habitat che zona di rinvenimento.

I caratteri diagnostici corrispondono perfettamente a quelli segnati dall'A. e a quelli successivamente annotati da LODDER (1934) e quindi

da LODDER e KREGER-VAN RIJ (1952). Riteniamo inutile ripeterli.

Piuttosto, prendiamo occasione per aggiungere alcune nostre osservazioni complementari.

1. Dimensioni e forma

Le dimensioni delle cellule ovali, in malto e in agar malto a 26°C., sono risultate in sufficiente accordo con quelle rilevate dagli Aa. conforme può osservarsi dall'annesso grafico (fig. 1).

Per quanto si riferisce alla forma, in malto, in agar-malto e in altri substrati, accanto a cellule ovali si incontrano cellule triangolari isolate od anche abbinate, spesso gemmanti agli angoli.

Il rapporto tra cellule

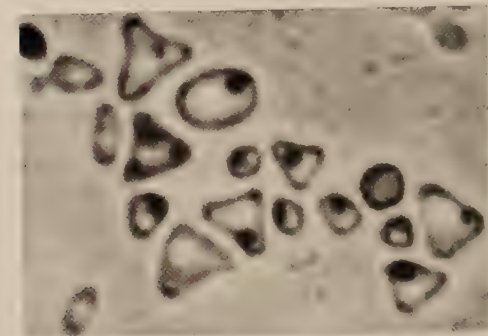


Fig. 2. Aspetto morfologico di *Tr. variabilis* su agar-malto

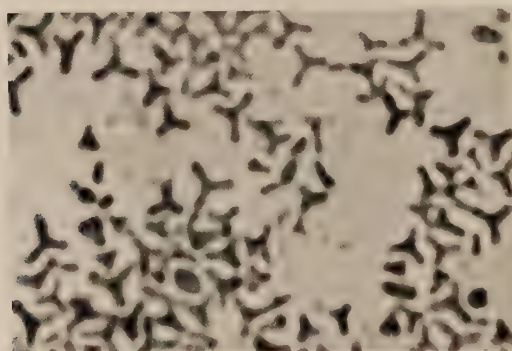


Fig. 3. Aspetto morfologico di *Tr. variabilis* in mezzi contenenti peptone o asparagina

triangolari e cellule ovali varia, come dopo preciseremo. Queste cellule triangolari hanno i lati ora più o meno retti, ora un poco concavi come già SCHACHNER ebbe ad osservare (fig. 2); in mezzi contenenti, però, asparagina o peptone la concavità si fa così rilevante che la forma triangolare scompare per sostituirsi una forma quasi stellata (fig. 3).

Il rapporto tra cellule triangolari e cellule ovali varia sensibilmente in relazione al mezzo e ad altre condizioni di coltura (fig. 4).

E'interessante osservare: a) l'influenza della temperatura, nel senso che le maggiori temperature spostano il rapporto in favore delle cellule

ovali che in certi casi assumono dominanza assoluta; b) l'influenza della sorgente azotata che tende, invece, a spostare il rapporto a favore delle cellule triangolari; c) la nessuna influenza, su tale rapporto, di sostanze antibiotiche (actidione) presenti nel mezzo.

2. Rilievi di ordine fisiologico

Trigonopsis variabilis, nel ceppo da noi studiato, si sviluppa nel liquido di Williams senza vitamine, seppure non abbondantemente.

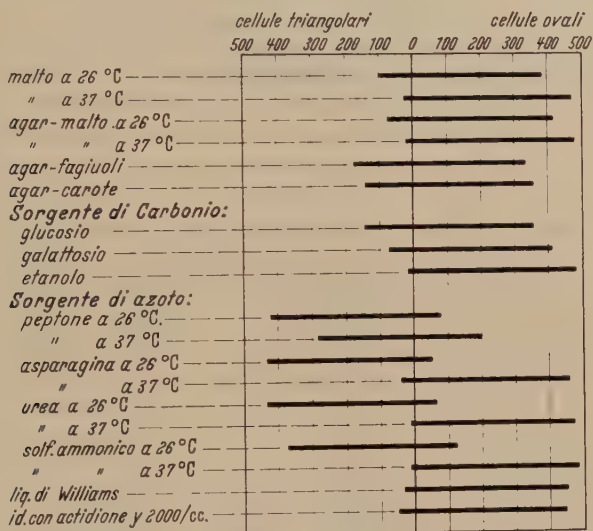


Fig. 4. *Tr. variabilis*. Condizioni di cultura e forma delle cellule

E' quindi specie auxo-autotrofa. In presenza di vitamine (biotina, tiamina, inosite, Ca-pantotenato, piridossina) lo sviluppo è però un poco maggiore.

Tr. variabilis tollera bene temperature relativamente elevate giacchè cresce prontamente e bene anche a 37 °C.

Tr. variabilis utilizza l'etanolo come sorgente di carbonio e sviluppa bene anche se l'alcool è presente nel mezzo in ragione del 7—8%.

Finalmente è rilevata, nel nostro ceppo di *Trigonopsis*, l'alta tolleranza agli antibiotici¹.

¹ Per questa ricerca abbiamo ritenuto interessante provare *Tr. variabilis* di fronte all'actidione. Come è noto rispetto a questo antibiotico i lieviti si comportano in maniera assai diversa. Molte specie, infatti, sono sensibilissime, come ad es. *Sacch. ellipsoideus*, inibito a γ 0.17/cc; molte altre sono invece relativamente tolleranti come le specie di *Kloeckera* e per le quali la dose inibente è $>$ di γ 1000/cc. Il nostro ceppo di *Tr. variabilis* si è dimostrato sviluppare, nel liquido di Williams, anche in presenza di γ 2000/cc di actidione.

Zusammenfassung

Trigonopsis variabilis, bisher erst einmal isoliert (1929), wurde in einem Traubenmost aus dem Weinbaugebiet des Staates S. Paulo, Brasilien, wieder aufgefunden. Es wird sein morphologisches und physiologisches Verhalten unter verschiedenen Kulturbedingungen beschrieben.

Bibliografia

LODDER, J.: Die anaskosporogenen Hefen. Verhandl. Koninkl. Akad. Wetenschap. Afd. Natuurkunde, sect. II. 1934. — LODDER, J., and N. J. W. KREGER-VAN RIJ: The Yeasts. North Holland Publisher Company Amsterdam 1952. — SCHACHNER, J.: Z. ges. Brauwesen 52, 137 (1929).

(Sección de Bioquímica, Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas,
Madrid, Spain)

***Sporobolomyces marcillae* nov. spec., isolated from the air**

By

JUAN SANTA MARIA

With 3 Figures in the text

(Eingegangen am 20. Juli 1958)

In the course of a study on yeast genetics, in which ascospore isolates were obtained by heat treatment of a sporulated culture, an apparently undescribed *Sporobolomyces* species was isolated from the agar surface of a petri dish.

Description

The following description is based on the standard procedures described by LODDER and KREGER-VAN RIJ (1952), LODDER, SLOOF and KREGER-VAN RIJ (1958) and WICKERHAM (1951).

Growth in malt extract. — After 3 days at 25° C. cells are long-oval to cylindrical, $(2.6-4.5) \times (3.2-11) \mu$, single. The ratio between length and width of the cells varies between 1.6—2.8. The growth is very slight (Fig. 1).

After one month at 17° C. a sediment and a mucous, salmon-colored pellicle are formed.

Growth on malt agar. — After 3 days at 25° C. the streak culture is salmon-red, flat, delicately wrinkled. The cells are long-oval to cylindrical $(2-3.5) \times (4.5-13) \mu$. Mycelium is also formed; the tips of the filaments may bear spores (Fig. 2). The culture has a slightly disagreeable odor.

After a month at 17° C. the streak culture is salmon-red, smooth, traised, soft and shiny.

Slide cultures. — True mycelium is formed.

Sporulation. — Spores are developed on malt extract-yeast extract agar and they are discharged on the lid of the Petri dish incubated in the inverted position. The ballistospores are kidney-shaped. (Fig. 3)

Fermentation. — Absent.

Sugar assimilation. — The assimilation tests were carried out in the liquid medium of WICKERHAM. Glucose (a sediment and a red pellicle are formed); galactose, —; sucrose, —; maltose, —; lactose, —.

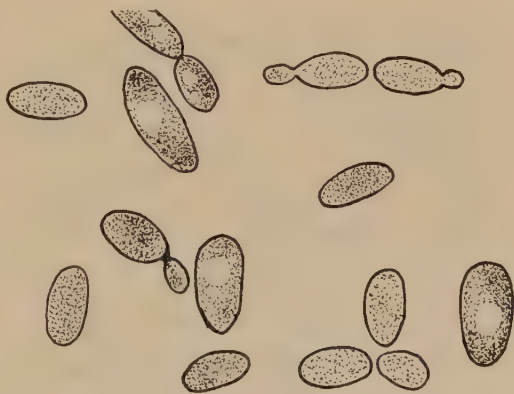


Fig. 1. *Sporobolomyces marcillae* nov. spec. After 3 days in malt extract. $\times 2000$

Assimilation of potassium nitrate. — The assimilation test was carried out in the liquid medium of WICKERHAM. The culture is incapable of assimilating nitrate. Ethanol as sole source of carbon. — Growth occurs as a red pellicle.

Discussion

The culture is included in the genus *Sporobolomyces* since it is a salmonred organism, that forms kidney-shaped ballistospores.

Within this genus no species has hitherto been described which forms a true mycelium, assimilates only glucose and is not capable of utilizing potassium nitrate as a source for nitrogen.

This organism is biochemically related to *Sporobolomyces gracilis*. It differs, however, morphologically from the latter species, by the formation of a true mycelium; this property is used in separating species in the genus *Sporobolomyces*. Because of this significant difference, the strain described must consequently be regarded as representative of a new species. For this species I propose the name *Sporobolomyces marcillae* in honour of the late PR. MARCILLA, Spanish Microbiologist.

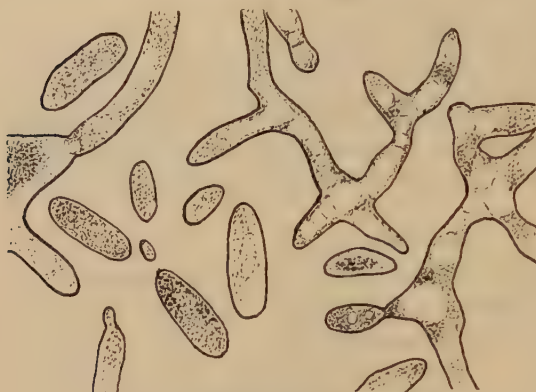


Fig. 2. *Sporobolomyces marcillae* nov. spec.
After 3 days on malt agar. $\times 2000$



Fig. 3. *Sporobolomyces marcillae* nov. spec. Ballistospores. $\times 850$

A culture of *Sporobolomyces marcillae* has been deposited in the Yeast Collection of the Central Bureau voor Schimmelcultures in Delft.

Latin diagnosis

Sporobolomyces marcillae nov. spec.

In musto maltato cellulae longovoideae aut cylindricae. $(2.6-4.5) \times (3.2-11) \mu$, singulae. Post unum mensem, 17°C . materia pelliculosa, ruber salmonis formata est. — In agaro maltato, post dies 3.25°C . cultura ruber salmonis crispulata; post

unum mensem, 17°C., cultura ruber salmonis, mollis, nitida.—Mycelium abundat.—Ballistosporae reniformae.—Fermentatio nulla. In medio minerali cum glucoso crescit. Nitras kalicus non assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico crescit, pellicula formatur.—Isolata ex aeris.

Summary

A new *Sporobolomyces* species has been isolated from the air. Its characteristic features are: nitrate not utilized, glucose only assimilated, a true mycelium produced.

This work was supported by a grant of The March Foundation.

Literature

LODDER, J., and N. J. W. KREGER-VAN RIJ: The Yeasts. A Taxonomic study. Amsterdam: North-Holland Pub. Co. 1952. — LODDER, J., W. CH. SLOOF and N. J. W. KREGER-VAN RIJ: The Chemistry and Biology of Yeasts. Chap. I. Edited by A. H. Cook. New York, Academic Press Inc. 1958. — WICKERHAM, L. J.: Taxonomy of Yeasts. U.S. Dept. Agr. Technical Bulletin, no. 1029, 1951.

(From the Department of Botany, Queen Mary College, University of London; and the Department of Botany, The Durham Colleges in the University of Durham; England)

Nuclear structure and Mitosis in the Euglenineae*

By

G. F. LEEDALE¹

With 29 Figures in the text

(Eingegangen am 13. Juni 1958)

The details of nuclear division in the *Euglenineae* were originally described by BLOCHMANN (1894) and KEUTEN (1895). These authors reported a longitudinal "cleavage" of the chromosomes and have since been supported in this contention by TSCHENZOFF (1916), R. P. HALL (1923, 1937), TANNREUTHER (1923), BAKER (1926), RATCLIFFE (1927), HALL and POWELL (1928), BROWN (1930), LOEFER (1931), JOHNSON (1934), LACKEY (1934), KRICHENBAUER (1937) and HOLLANDE (1942). Several groups of workers oppose this school of thought. DANGEARD (1902, 1910, 1938), DEHORNE (1920) and CHADEFAUD (1939) support the "chromospire" theory, that the chromatin is a continuous spireme which breaks transversely during nuclear division. A transverse cleavage, but of individualised chromosomes, has been reported by HARTMANN and CHAGAS (1910), BĚLAŘ (1916, revised later in 1926), S. R. HALL (1931) and GOJDICS (1934). Nuclear division by amitosis is recorded by STEUER (1904), DOBELL (1908) and WENRICH (1924). Peculiar accounts of nuclear division (with chromosomes inside the endosome, for example) have been given by von PROWAZEK (1903), BERLINER (1909), HAASE (1910) and SCHÜSSLER (1917).

These authors, together with the other major writers on the euglenoid nucleus, ZUMSTEIN (1900), ALEXEIEFF (1911, 1913), KARL (1915), JÍROVEC (1926, 1927), GÜNTHER (1927), MAINX (1927), DREZEPOLSKI (1929) and GIMESI (1930), could be placed in different groups according to whether or not they record the presence of centrosomes and centrioles, whether they interpret the interphase chromatin as being truly granular, what they consider to be the function of the endosome, and how and when they think the chromosomes divide and the chromatids separate.

* Part of a Thesis approved for the Degree of Doctor of Philosophy in the University of London.

¹ Durham Colleges Research Fellow in Pure Science. Present address: University Science Labs., South Road, Durham.

Disadvantages of the published accounts are the absence of photomicrographs, and the fact that most authors have confined their investigations to one species. Only by working with a range of species, preferably examined by a number of microscopical, cytological and experimental techniques, can the range of structure within the group be observed and the features common to all species be recognised.

The present paper is an account of the structure of the euglenoid nucleus in interphase and during mitosis. Description of my observations and discussion of the records of previous authors have been combined into a single section for any one topic. A more general discussion on the mitotic mechanism is placed towards the end of the paper. The descriptions of nuclear structure are based on the examination of stained preparations of fixed material and observation of the living, dividing nuclei.

Future papers on the *Euglenineae* will deal with the behaviour of the cell and cell organelles during division; the time, rate, duration, chemistry and radiosensitivity of the mitosis; and chromosome numbers, amitosis and meiosis.

I. Material and Methods

A. Species studied

More than 40 species have been grown in uni-algal culture and examined for various features. The three main sources of material have been the Sammlung von Algenkulturen, Göttingen, the Cambridge Culture Collection of Algae and Protozoa, and my own wild collections. Species have mainly been isolated by Professor Dr. E. G. PRINGSHEIM or myself. The following 24 species, drawn from 13 genera, have been examined in detail for nuclear structure and mitosis. The names of species are corrected according to PRINGSHEIM (1956) for the genus *Euglena* and HUBER-PESTALOZZI (1955) for the remaining genera.

Astasia klebsii Lemmermann; *Colacium cyclopicola* (Gicklhorn) Bourrelly; *Colacium mucronatum* Bourrelly; *Cryptoglena pigra* Ehrenberg; *Distigma proteus* Ehrenberg em. Pringsheim; *Euglena acus* Ehrenberg; *Euglena communis* Gojdics; *Euglena deses* Ehrenberg; *Euglena ehrenbergii* Klebs; *Euglena gracilis* Klebs; *Euglena spirogyra* Ehrenberg; *Euglena viridis* Ehrenberg; *Eutreptia pertyi* Pringsheim; *Eutreptia viridis* Ehrenberg; *Hyalophacus ocellatus* Pringsheim; *Lepocinclis ovum* var. *buetschlii* Conrad (nov. comb. Huber-Pestalozzi); *Lepocinclis steinii* Lemmermann em. Conrad; *Menoidium cultellus* Pringsheim; *Peranema trichophorum* (Ehrenberg) Stein; *Phacus pusillus* Lemmermann; *Phacus pyrum* (Ehrenberg) Stein; *Strombomonas verrucosa* var. *conspersa* (Pascher) Deflandre; *Trachelomonas bulla* Stein em. Deflandre; *Trachelomonas grandis* Singh.

B. Cultivation

Cells were isolated from wild collections by the micropipette method (PRINGSHEIM 1946a). All species except *Peranema trichophorum* were grown in biphasic culture (PRINGSHEIM 1946a, 1946b); with a wheat grain beneath the soil for *Trachelomonas bulla* and *Hyalophacus ocellatus*; ammonium magnesium phosphate for all other green species; and starch for all other colourless species. *Eutreptia* spp. were grown in tubes with 50% sea-water. *Peranema trichophorum* was grown in soil extract containing 0.5% milk, or in cultures of other species on which it could feed.

Green and colourless forms of *Euglena gracilis* were also cultivated in organic media: 0.2% Difco beef extract; or a medium containing 0.1% sodium acetate, 0.2% Difco tryptone, 0.1% Difco beef extract, and 0.2% Difco yeast extract, in distilled water.

Cultures were hung in a north-facing window or in temperature-controlled cabinets with incandescent or fluorescent lighting on a time-switch. A standard temperature of 20° C was maintained.

The media recommended by previous authors for particular species were tested but in most cases found to be unsatisfactory.

C. Cytological techniques

The cells were handled by low-speed (250 r.p.m.) centrifugation.

Material was fixed in methanol or CARNOY'S acetic-alcohol and stained with aceto-carmine following a ferric acetate mordant, or by the FEULGEN reaction.

Other fixatives (Acetic sublimate, BOUIN'S, CHAMPY'S, Chrom-acetic-osmic, FLEMMING'S, NAVASHIN'S, Osmic vapour, SCHAUDINN'S, SCHAUDINN'S without acetic, and ZENKER'S) and stains (BORRELL'S, DELAFIELD'S hematoxylin, FLEMMING'S triple, HEIDENHEIN'S hematoxylin + Bordeaux red, and iron-alum hematoxylin + eosin or orange G) were tested but were found to be inferior to those adopted as the standard reagents for this study. UNNA'S methyl-green-pyronin B stain (UNNA 1902) has been used in combination with ribonuclease (BRACHET 1940, 1953) and deoxyribonuclease as a test for the distribution of the nucleic acids. The nucleases have also been used in combination with the FEULGEN reaction.

To facilitate the squashing of species with an elastic periplast, the cells were treated overnight with a saturated solution of pepsin at 25° C.

The photomicrographs were taken on Ilford rapid process panchromatic plates with a Zeiss apo. 0.80—1.32 N.A. $\times 100$ Imm. objective and a $\times 10$ ocular. Living cells were examined by positive phase contrast and Reichert anoptical contrast.

D. Experimental techniques

Irradiation with X-rays (from a therapy tube) and fast electrons (from a van de Graff generator) was carried out at the Medical Research Council's Radiopathology Laboratory at Hammersmith Hospital, London. In the preliminary experiments, X-ray doses (given at 40 rad/second) were 300, 1,000, 3,000, 10,000 and 30,000 rad. Electron doses (given at 2,500 rad/second) were 30,000, 100,000, 300,000, 1 million and 3 million rad.

Colechicine was administered to cultures of various species at concentrations ranging from 0.001 to 4.0%.

II. The structure of the nucleus in the interphase cell

A. Position, shape and size of the resting nucleus

The nucleus lies in the central region of the cell in species with an elastic periplast: species of *Astasia*, *Colacium*, *Distigma*, *Euglena*, *Eutreptia* and *Peranema*, with the exception of *Euglena viridis* where the nucleus is posterior. During metabolism the nucleus may be pushed to any part of the cell (especially in species of *Astasia* and *Eutreptia*). In most species with a rigid periplast: species of *Cryptoglena*, *Hyalophacus*, *Lepocinclis*, *Menoidium* and *Phacus*, the resting nucleus is posterior in the cell, but in *Menoidium cultellus* it is central (Fig. 10). The nucleus lies

in the central or posterior regions of the cell in different species of *Strombomonas* and *Trachelomonas*.

In the majority of species, the interphase nucleus is spherical or slightly ovoid. This is so for all species with an ovoid cell (species of *Phacus*, *Trachelomonas*, etc.) and for many with elongate cells (Figs. 1, 4 and 10). In some elongate cells, the nucleus is itself long and narrow (*Euglena acus*, Fig. 9). The nucleus is plastic and is capable of much distortion during metabolism.

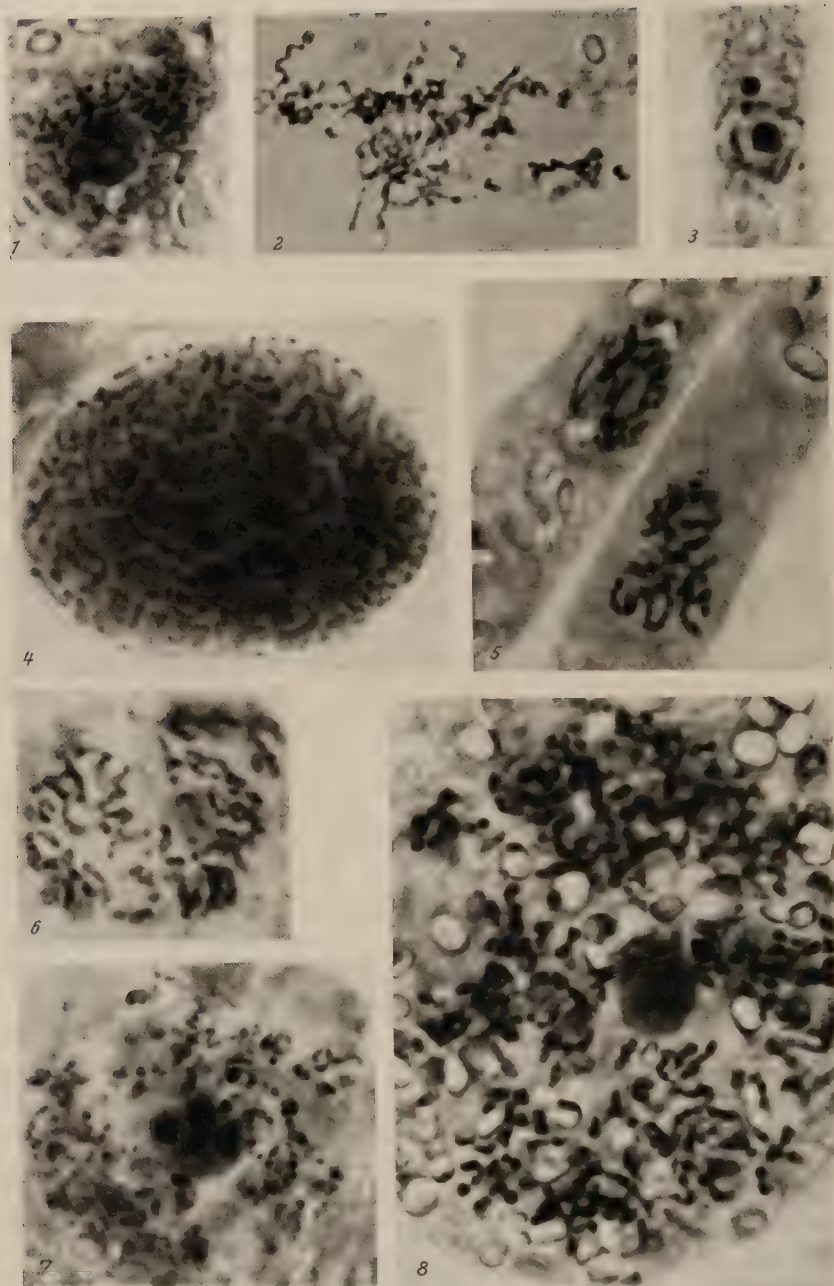
CHU (1947) has shown a correlation between cell-size and the size of the nucleus. In the species examined in the present study, the size of the nucleus ranges from 2—3 μ diameter in *Phacus pusillus* to $20 \times 30 \mu$ in *Euglena ehrenbergii* (Fig. 4).

B. The endosome in the resting nucleus

The one or more staining bodies in the resting nucleus are referred to in this paper as "endosomes". The homology of the endosome is uncertain. In staining reaction it behaves as a true nucleolus, and has been interpreted as such by numerous workers from DANGEARD (1902) to HOLLANDE (1942). It stains with hematoxylin, aceto-carmin, eosin, orange G and light green. It is Feulgen-negative. Staining with methyl green and pyronin B by the Unna Pappenheim technique, both before and after treatment with ribonuclease, shows the endosome to contain ribonucleic acid (RNA) but no deoxyribonucleic acid (DNA). PRINGSHEIM (1956, p. 24) obtained some indication with May-Grünwald preparations that the endosome contained neither RNA nor DNA. He has since expressed agreement with my observation that RNA is present (1957, private communication).

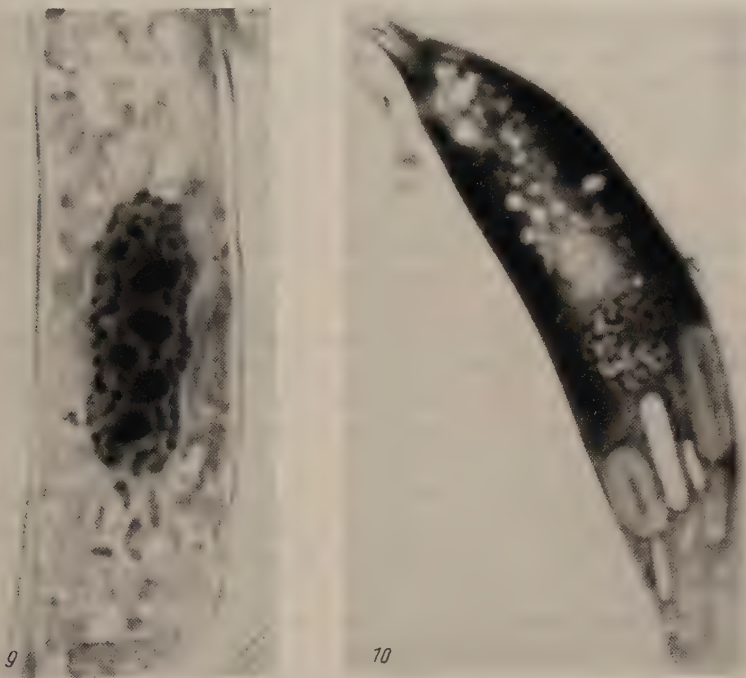
However, the behaviour of the endosome during mitosis (its persistence, division, and retention of RNA—see later) sets it apart from normal nucleoli and the non-committal term "endosome" (MINCHIN 1912, CALKINS 1926, see JAHN 1946) is to be preferred. Previous authors have given the endosome names based on its supposed function, "nucleolocentrosome" (KEUTEN 1895), "centronucleolus" (von PROWAZEK 1903), "karyosome" (HARTMANN and CHAGAS 1910, BĚLAŘ 1916), but there is no evidence to justify these. "Binnenkörper" is an equivalent non-committal name used by DOFLEIN (1912) and TSCHENZOFF (1916).

Among the species I have examined there is a single, spherical or ovoid endosome in the centre of the nucleus in *Cryptoglena pigra*, *Euglena communis*, *Euglena gracilis*, *Eutreptia* spp., *Hyalophacus ocellatus*, *Lepocinclis* spp., *Menoidium cultellus*, *Phacus pusillus* and *Trachelomonas grandis* (Figs. 1, 8 and 10). The number of endosomes is variable in several species. There is usually one, but there may be two or more, in *Astasia klebsii*, *Colacium* spp., *Euglena deses*, *Euglena spirogyra*, *Euglena viridis*,



Figs. 1 to 8. Resting nuclei in the *Euglenineae*. All $\times 2000$; all aceto-carmine. Fig. 1. *Euglena gracilis*. Fig. 2. *Euglena gracilis*, free nucleus squashed after treatment with pepsin. Fig. 3. *Distigma proteus*. Fig. 4. *Euglena ehrenbergii*. Fig. 5. *Astasia klebsii*, two cells. Fig. 6. *Eutreptia viridis*, nucleus flattened in cell. Fig. 7. *Strombomonas verrucosa* var. *conspersa*, nucleus squashed in cell. Fig. 8. *Trachelomonas grandis*, nucleus flattened in cell.

Strombomonas verrucosa var. *conspersa* and *Trachelomonas bulla* (Fig. 7). In the last-named species, the single endosome is often lobed and irregular in shape. In *Distigma proteus* most cells have two endosomes, one large and one small (Fig. 3). HOLLANDE (1937, 1942) describes the smaller as being in a concavity of the larger but I have rarely found this to be the



Figs. 9 and 10. Interphase cells with resting nuclei. $\times 2000$; aceto-carmin. Fig. 9. *Euglena acus*.
Fig. 10. *Menoidium cultellus*.

case. Species which almost always have more than one endosome in the resting nucleus include *Euglena acus*, *Euglena ehrenbergii*, *Phacus pyrum* and *Peranema trichophorum* (Figs. 4 and 9).

Systems of rhizoplasts from the basal granules of the flagella to the endosome or to a "centrosome" on the nuclear membrane have been described by von PROWAZEK (1903), HALL (1923), BRETSCHNEIDER (1925), BAKER (1926), HALL and POWELL (1928), HALL and JAHN (1929), BROWN (1930) and JOHNSON (1934). On the evidence of both stained preparations and anoptical contrast observations of living cells, I must join the recent workers in this field (KRICHENBAUER 1937, HOLLANDE 1942) in denying the presence of any such structures. PRINGSHEIM (1948, 1956) makes no mention of rhizoplasts, though describing the flagellar apparatus in detail.

In most species the endosome is homogeneous. Vacuoles often appear in the endosomes of stained nuclei, but are not seen in the living nucleus under anoptral contrast. These vacuoles [and those described by previous authors (e. g. RATCLIFFE 1927)] are fixation artefacts. In a few species vacuoles seem to occur in definite patterns (Fig. 7), but whether these are an indication of structure within the endosome is not clear.

Previous authors have referred to "entire" or "fragmented" endosomes in the belief that the "fragments" always fused to give one body before division. This is not so (see later) and the several endosomes of one nucleus can be considered as separate bodies which may or may not fuse prior to mitosis.

C. The chromatin in the resting nucleus

In all species of the *Euglenineae* the chromatin of the resting nucleus appears in stained preparations as granules or threads dispersed in the nucleoplasm. Under anoptral contrast, a narrow clear space is seen between the inner boundary of the chromatin and the endosome(s), and its outer boundary and the nuclear membrane.

The chromatin is iron-attractive and Feulgen-positive. The Unna Pappenheim technique with nuclease treatment shows the chromatin to be DNA-positive and RNA-negative.

The chromatin appears as granules with occasional granular threads in *Colacium cyclopicola*, *Colacium mucronatum*, *Euglena acus*, *Euglena communis*, *Euglena deses*, *Euglena gracilis*, *Euglena spirogyra*, *Hyalophacus ocellatus*, *Lepocinclis steinii*, *Peranema trichophorum*, *Phacus pyrum*, *Strombomonas verrucosa* var. *conspersa*, *Trachelomonas bulla* and *Trachelomonas grandis* (Figs. 1, 7, 8 and 9). Several of these species have a rather variable form to the resting nucleus, conditions existing between "diffuse" and "condensed" states. In the "diffuse" nucleus the chromatin is granular; in the "condensed" nucleus the chromatin is tightly packed, threads are more obvious, and the nucleus is much smaller. The forms may be stages in the reconstitution of the true resting condition, but it is likely that they are merely a reflection of the physiological state of the cells. If a "granular" resting nucleus is isolated from the cell by treating the proteinaceous cell wall with pepsin and squashing the nucleus out, it can be flattened to show that the chromatin exists during interphase as long threads (Fig. 2). These appear homogeneous in some parts and granular in others, apparently of staining and nonstaining regions (see also Fig. 8).

Species in which the chromatin of the resting nucleus is always obviously composed of threads are *Astasia klebsii*, *Cryptoglena pigra*, *Distigma proteus*, *Euglena ehrenbergii*, *Eutreptia pertyi*, *Eutreptia viridis*, *Lepocinclis ovum* var. *buetschlii*, *Menoidium cultellus* and *Phacus pusillus*

(Figs. 3, 4, 5, 6 and 10). The threads may be granular structures (*Astasia klebsii*, Fig. 5) or may stain as threads of uniform thickness. In *Eutreptia* spp. occasional threads show wider regions with a central space (Fig. 6). This indicates the double structure of these threads which exist in the interphase as pairs of chromatids. In some regions the two strands separate sufficiently to stain as two threads side by side. The living nucleus under anoptral contrast shows the (apparently relational) coiling of these paired chromatids more clearly. The coiling is lax in the living cell; fixation and staining bring the strands closer together and hide much of the coiling. The single chromatin threads of *Eutreptia viridis* appear uniform in thickness under anoptral contrast, but in other species the relatively thicker threads appear granular, as lines of bright dots. This could be due to a basic structure of two relationally coiling strands, the bright dots being the denser parts where the strands cross one another. In most species, however, a double structure is not seen in the chromatin of the fixed, stained nucleus.

In *Euglena viridis* the chromatin of the resting nucleus consists of granules, threads and large lumps which are generally on the periphery of the nucleus.

These descriptions of the chromatin of the interphase nucleus differ considerably from the accounts of most previous workers. HOLLANDE (1942) makes some attempt to integrate the published observations but is misguided in his efforts to impose one description of the appearance of the stained nucleus on all species. As indicated above, the underlying structure of the chromatin is the same for all species, the appearance in the stained nucleus is not. HOLLANDE's statement that chromatin granulations are a constant feature of all euglenoid nuclei is incorrect. His final picture of the chromatin of the resting nucleus is of small blocks of chromatin joined in moniliform filaments by fine links. These links are attached to minute iron-attractive granules in the centre of each block of chromatin, the granules and their attachments staining differently from the chromatin, even by the Feulgen reaction. The chromatin itself is said to be non-iron-attractive (!).

Having worked with some of the species used by HOLLANDE [in particular *Euglena gracilis*, which he refers to as "*Euglena americana*" (see PRINGSHEIM 1956, p. 133)], the small size of the chromatin granules leads me to question the resolving power of his microscope which enabled him to see dots within the granules, and fine links joining them. He worked with a Stiassnie 1/15th Imm. objective and Zeiss $\times 20$ oculars. at a magnification at which the definition must have been extremely poor. His interpretation cannot be accepted.

It should be noted that for two relationally coiling strands, the "granules" seen under phase or anoptral contrast would occur at the

points of crossing (the densest part to the observer), whereas in stained preparations the "granules" would appear where the strands are lying side by side (the widest part to the observer). It is possible that the "links" of HOLLANDE's (1942) interpretation were the points of crossing of two coiling strands, his "chromatin blocks" the two strands lying side by side.

Apart from the descriptions of granular and homogeneous nuclei (the latter probably badly fixed), there are the descriptions by DANGEARD (1902, 1910, 1938) and DEHORNE (1920) of the "chromospire". According to these authors, the chromatin exists in interphase (and during division) as a single, continuous strand. This interpretation has doubtless resulted from misobservation of the more "filamentous" type of resting nucleus.

III. Mitosis

Nuclear division in the *Euglenineae* is here described as a true mitosis. Consideration of the evidence for this interpretation is delayed until the discussion at the end of this section.

The terms "prophase", "metaphase", "anaphase" and "telophase" are retained for the stages of division, but they are used with circumspection, without implying the chromosome structure and arrangement found in the mitosis of higher organisms.

A. Prophase

1. Movement of the nucleus

The first sign of approaching mitosis in the *Euglenineae* is a migration of the nucleus from its interphase position towards the anterior of the cell. The movement is most marked in elongate species, particularly in the long, narrow cells of *Euglena acus* and *Euglena spirogyra*.

In all species the prophase migration brings the nucleus into a position adjacent to the reservoir, and during mitosis these two organelles may be in close contact (Figs. 13 and 18). Under anoptral contrast, the reservoir and the nucleoplasm are seen as clear areas, separated by a single line which is the wall of the reservoir and the nuclear membrane in juxtaposition.

Despite this apparent association, it has not been possible to demonstrate any relationship between nuclear division and the basal granules of the flagella, such as is recorded by several authors (BAKER 1926, RATCLIFFE 1927, HALL and POWELL 1928, BROWN 1930, and LACKEY 1933).

Prophase movement towards the reservoir brings the nucleus into the anterior end of the cell in elongate species (Fig. 18) and to anterior of centre in ovoid species. Cells of *Eutreptia* spp. and *Peranema trichophorum* round off during mitosis and the dividing nucleus lies in the centre of the cell.

Another consequence of the nuclear migration is the displacement of chromatophores and paramylon towards the posterior. This is most marked in species such as *Euglena spirogyra* in which the large paramylon link which is normally anterior to the nucleus becomes pushed behind the nucleus to lie with the other, normally posterior, link (Fig. 18).

BAKER (1926) erroneously describes the anterior migration of the nucleus in *Euglena "agilis"* (= *Euglena gracilis*) as occurring in metaphase.

2. The endosome in prophase

The single endosome undergoes slight elongation so that by late prophase-early metaphase it is oval or rod-shaped along the division axis, perpendicular to the anterior-posterior axis of the cell (Fig. 12). Where there are several endosomes in the interphase nucleus, these fuse to form a single body, usually during the anterior migration of the nucleus. Exceptions to this rule are *Euglena acus* where fusion to one body never occurs, *Peranema trichophorum* where fusion often fails to occur (Fig. 17), and *Euglena deses* and *Phacus pyrum* where fusion occurs in all but a few cases.

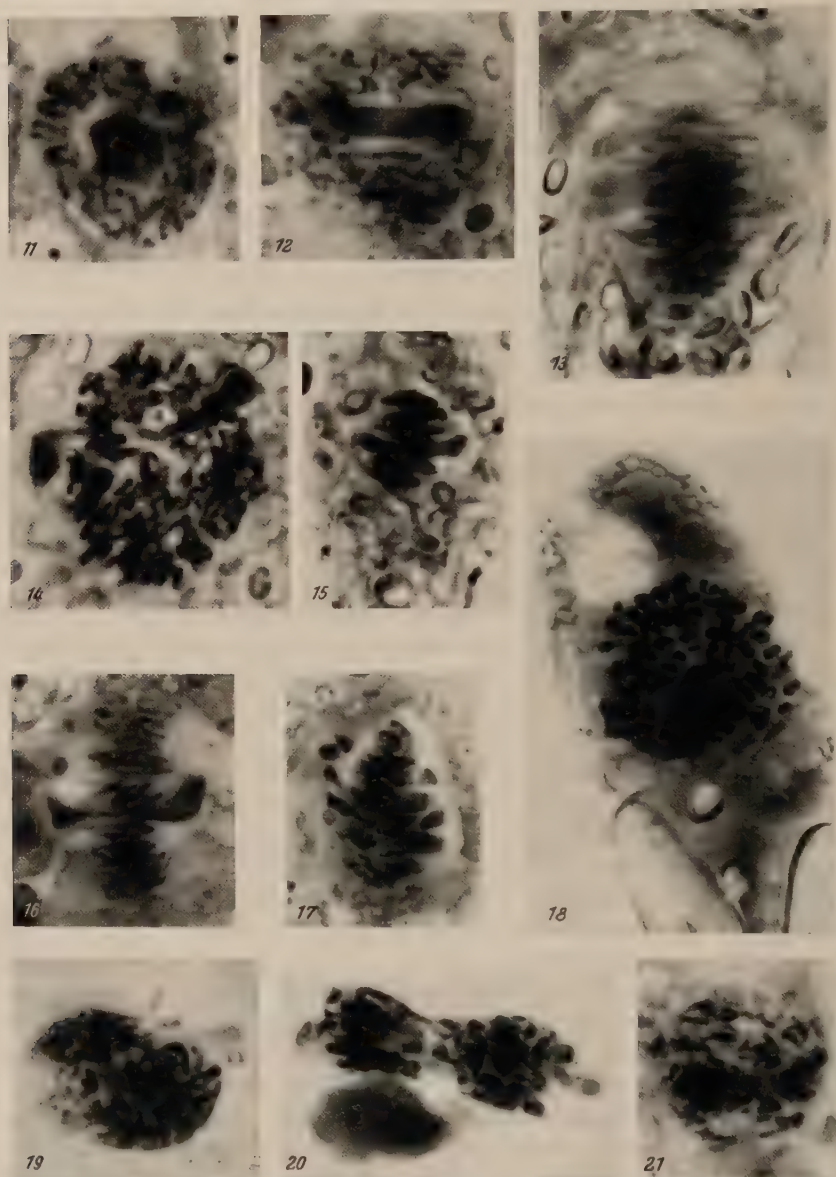
3. The chromatin in prophase

The chromatin becomes more evenly stained during prophase in those species in which the interphase nucleus has a granular appearance. This results in the filamentous structure becoming more readily seen (compare Figs. 1 and 11). In those species in which the interphase chromatin appears as threads, there is little change in the prophase nucleus.

These changes have been referred to by previous authors as "the formation of the chromosomes". This phrase is misleading as the chromosomes are already formed and retain their individuality during interphase. Changes in prophase merely render the chromosomes more readily discernible in stained preparations.

It is known from study of anaphase and telophase stages (see later) that in some species the daughter chromosomes enter interphase as double threads. This structure is retained throughout interphase and into prophase. In other species chromosome duplication occurs during prophase or metaphase.

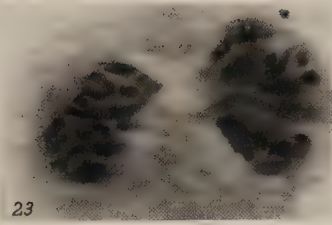
The double structure of the chromatin threads in prophase is clearly seen in some species under anoptical contrast. In *Euglena gracilis* the prophase threads are very fine and show no signs of a double structure (Fig. 11). From such observations it has become clear that the time of chromosome duplication differs in different species of the *Euglenineae*. The time of chromatid separation also varies, occurring in several species in late prophase as the threads are becoming orientated to lie along the division axis. These points are dealt with below.



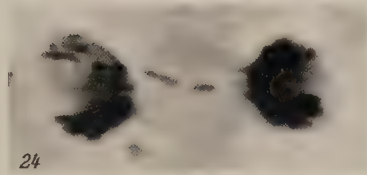
Figs. 11 to 27. Mitosis in the *Euglenineae*. All $\times 2000$; all aceto-carmine except Fig. 24. Fig. 11. Prophase in *Euglena gracilis*. Fig. 12. Early metaphase in *Euglena gracilis*. Fig. 13. Metaphase in *Euglena gracilis*. Fig. 14. Metaphase in *Euglena gracilis* (similar stage to Fig. 13.), flattened in the cell. Fig. 15. Metaphase in *Colacium mucronatum*. Fig. 16. Early anaphase in *Peranema trichophorum*, the endosome dividing as a single body. Fig. 17. Metaphase-early anaphase in *Peranema trichophorum*, seven dividing endosomes. Fig. 18. Metaphase in *Euglena spirogyra*, polar view, differentiated to show the longitudinal duplication of the chromosomes. Fig. 19. Metaphase in *Eutreptia viridis*. Fig. 20. Anaphase in *Eutreptia viridis*. Fig. 21. Anaphase in *Phacus pyrum*.



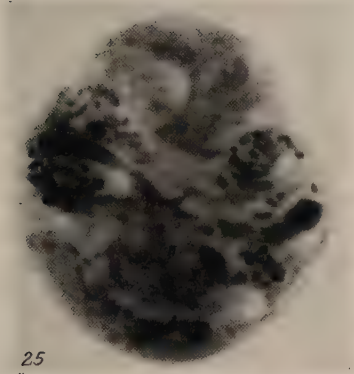
22



23



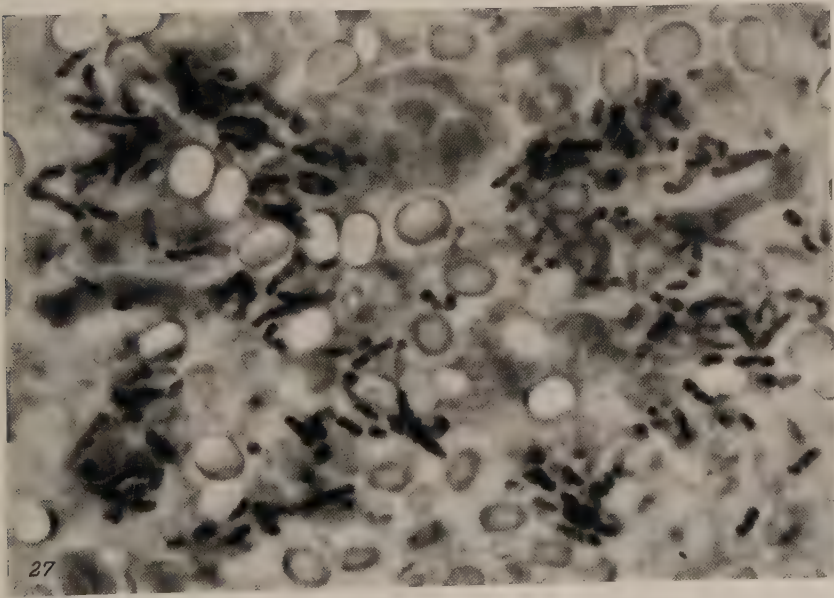
24



25



26



27

Fig.22. Anaphase in *Eutreptia pertyi*. Fig.23. Late anaphase-telophase in *Eutreptia viridis*. Fig.24. Late anaphase-telophase in *Eutreptia viridis*, stained by the Feulgen reaction to show the lagging chromatids. Fig.25. Late anaphase in *Euglena gracilis*. Fig.26. One of the two telophase groups of daughter chromosomes in *Trachelomonas grandis*. Fig.27. Anaphase in *Trachelomonas grandis*.

B. Metaphase and Anaphase

1. Endosome structure and division

Elongation of the endosome during mitosis occurs in two stages. During late prophase and early metaphase the endosome becomes rod- or dumbbell-shaped along the division axis (Figs. 12, 14, 15 and 19). It then ceases to elongate during late metaphase and early anaphase while the chromatin threads become orientated and begin to move to the poles (Figs. 16, 20 and 21). The second period of endosome elongation occurs during late anaphase, as the daughter groups of chromatids pass to opposite sides of the cell (Fig. 25).

The endosome becomes markedly dumbbell-shaped in metaphase in *Euglena gracilis* and *Peranema trichophorum*, and retains this shape throughout mitosis (Figs. 14 and 16). In many species, the long endosome is only slightly swollen at the ends (e. g. *Colacium mucronatum*, Fig. 15), or is a rod of uniform thickness (e.g. *Eutreptia viridis* in metaphase, Fig. 19, and *Trachelomonas grandis* throughout division, Fig. 27). The several endosomes of *Euglena acus* each become dumbbell-shaped during mitosis, as do those of *Euglena deses*, *Peranema trichophorum* and *Phacus pyrum* when the endosomes do not fuse (Fig. 17).

In most of the species investigated, the endosome protrudes beyond the chromatin at some stage during mitosis. This condition is most marked at metaphase (Figs. 13—17 and 19) but often continues into anaphase (Fig. 20), the extremities of the endosome projecting towards the poles of the division axis from each of the groups of daughter chromosomes. In *Astasia klebsii* and *Menoidium cultellus*, the endosome is an oval rod surrounded by chromatin threads at metaphase, the chromatids preceding the ends of the endosome to the poles in anaphase.

The "breaking" of the mid-region of the endosome, marking the end of anaphase, occurs in the same way in all species. The whole of the central region, which may be straight (Fig. 27) or bent (Fig. 25), thins rapidly and disappears. The thinning in late anaphase seems to be due to a sudden flowing of material to the poles. There is no loss of material into the cytoplasm, the whole of the endosome being incorporated into the two daughter bodies.

2. Centrosomes and centrioles

Centrioles have been recorded for species of the *Euglenineae* by BERLINER (1909), HAASE (1910), HARTMANN and CHAGAS (1910), KARL (1915), BĚLAŘ (1916), SCHÜSSLER (1917), JÍROVEC (1926) and DANGEARD (1938). The centrioles are variously described as being within the endosome, within the nucleus but outside the endosome, or outside the nucleus.

Most authors make no mention of centrioles, but a number state that they are absent, including DOBELL (1908), HALL (1923), BAKER (1926), HALL and POWELL (1928), LACKEY (1929), BROWN (1930), LOEFER (1931), JOHNSON (1934), KRICHENBAUER (1937) and HOLLANDE (1942). The evidence of the present study supports this latter group of authors, that visible intra- or extra-endosomal centrioles and intra- or extra-nuclear centrosomes are absent.

Those authors who have described a rhizoplast system from the motor apparatus to the nucleus have usually included a centrosome on the nuclear membrane in their descriptions. A number of authors have considered that the basal granules of the flagella are blepharoplasts and act as division centres, especially in *Peranema trichophorum* (HALL and POWELL 1928, BROWN 1930, LACKEY 1933). This question has been dealt with in some detail by LACKEY (1933, 1934) and his final conclusion for *Astasia dangeardii* Lemm. and *Distigma proteus* was that despite the regular anterior migration of the nucleus prior to mitosis, the "blepharoplasts" were "manifestly not at the poles of the division figure" and could not possibly be acting as division centres.

This conclusion has been reached in the present study for all species, including *Peranema trichophorum*. It can be clearly seen in the living cells that the basal granules of the flagella are not situated at the poles of the dividing nucleus. The reservoir and basal granules move about independently of the nucleus, as a result of the intense metaboly of the cell, during division.

BAKER [1926, for *Euglena* "agilis" (= *Euglena gracilis*)] and RATCLIFFE (1927, for *Euglena spirogyra*) have described in detail the emergence from the endosome of a body which passes from the nucleus to participate in the division process. The validity of these accounts has been tested in the species concerned by following the complete division process under anoptral contrast. No budding-off of bodies from the endosome occurs, either before, during, or after mitosis. This is so in all species examined. Nuclei are occasionally found in stained preparations which could be made to fit in with the accounts of BAKER and RATCLIFFE. The smaller of the two endosomes in *Distigma proteus* (Fig. 3) sometimes appears outside the chromatin, and other cases of endosomes external to the chromatin have been seen. These are exceptions, and the extruded endosomes (which are still within the nuclear membrane) never behave as described by BAKER and RATCLIFFE. These authors have apparently been too eager to find, in the *Euglenineae*, rhizoplast systems and related structures such as have been described for other groups of flagellates. Accounts of centrioles, centrosomes and "intranuclear bodies" probably derive from misinterpretation of nuclei with several endosomes, and from observation of cytoplasmic granules and droplets.

3. Function of the endosome

When authors have assumed the endosome to be a passive body during mitosis, control of division has been ascribed to the basal granules of the flagella acting as blepharoplasts, to an extranuclear centrosome, to a spindle, or to some other, undefined, agency. In the accounts of those authors who connect the endosome directly with the division process, the endosome has been thought to contain centrioles, or to bud off a centrosome, or to combine the functions of a nucleolus and a spindle.

Descriptions of blepharoplasts, centrioles and centrosomes have been considered above and, as stated, no structural evidence has been found to support any of these accounts. Similarly, the present study has produced no evidence to support the theories which envisage the whole endosome as a centrosome, or equivalent to a spindle (BLOCHMANN 1894, KEUTEN 1895, HARTMANN and von PROWAZEK 1907).

The exposition of these theories has not been supported by any experimental or structural evidence. They are of as little value as the evolutionary systems and phylogenetic conclusions which have been based on them and on rhizoplast structure, relating the *Euglenineae* to other flagellates. There also seems little value in the complex classifications of mitosis types which several of the early authors built up, relating the flagellates to other organisms (von PROWAZEK 1903, HARTMANN and von PROWAZEK 1907, DOBELL 1908, CHATTON 1910, HARTMANN and CHAGAS 1910, ALEXEIEFF 1913, KUHN 1915 and DREZEPOLSKI 1929).

The present study has indicated that the endosome is a passive body which divides during mitosis but does not direct or control the process.

Irradiation at the non-lethal dose of 100,000 rad of ionizing radiation (fast electrons) has been found not to damage or break the endosome. The higher doses (300,000 rad +), which kill the cells, also produce no visible damage to the endosome. With the non-lethal doses, the higher the dose the longer is the recovery period before mitosis recommences.

Colchicine has no inhibiting effect on any part of the division process. It certainly does not prevent normal behaviour of the endosome during mitosis. If the endosome is homologous with the centrosome or spindle of higher organisms, it functions in a way unaffected by one of the most efficient inhibitors of "normal" mitosis.

0.1% ribonuclease and deoxyribonuclease halted mitosis in all species treated, killing the cells within a few days after the cultures had been treated with the enzyme for 30 minutes.

4. Homology of the endosome

The possible homology of the endosome with a centrosome or spindle has been considered. There remains the question of the relationship between the euglenoid endosome and the nucleolus of higher organisms.

Endosomes are similar to nucleoli in their shape and position in the resting nucleus; in their staining affinities; in being Feulgen-negative; in containing ribonucleic acid; and in their ability to fuse and fragment.

Endosomes differ from nucleoli in their persistence and division during mitosis; in their retention of ribonucleic acid during mitosis; and in not being associated with particular (nucleolar-organising) chromosomes.

This last point needs some expansion. It is true that none of the visible, staining chromosomes has a nucleolar-organising association with the endosome. Also there is no visible structure within the endosome. However, in higher organisms the nucleolar-organising chromosome, or the nucleolar-organising region, is invisible when inside the nucleolus. It is possible that a similar structure exists within the endosome of the *Euglenineae*, never becoming visible since, unlike a nucleolus, the endosome does not break down during nuclear division. The vacuoles seen within the endosome in fixed material are artefacts, but they may indicate an internal structure.

The endosome certainly has close affinities with true nucleoli. Several records of persistent nucleoli have been made for mitosis in flowering plants (see BROWN and EMERY 1957), but in all cases these nucleoli are excluded from the daughter nuclei and eventually disintegrate in the cytoplasm. It seems desirable to maintain the present distinction, based on the behaviour of the endosome and the nucleolus during mitosis.

5. Chromatin orientation

The late prophase nucleus is anterior in position; the endosome is single in most species; the chromatin consists of a sphere of threads coiling about the endosome.

The "threads" of prophase are chromosomes. In some species chromatid segregation occurs during late prophase and early metaphase; in other species the segregation is delayed until late metaphase. The "threads" of full metaphase may therefore be chromosomes or chromatids. To avoid confusion, the term "threads" is used throughout the following description of metaphase in the various species. A discussion on whether the metaphase "threads" of a particular species are chromosomes or chromatids is given later.

In early metaphase the endosome is oval or rod-shaped, of uniform thickness with rounded ends. The chromatin threads, of different lengths, lie unorientated in the nucleoplasm. They are single, fine and uniform in thickness in some species, for example in *Euglena acus*, *Euglena gracilis* and *Euglena spirogyra* (Fig. 12). In other species, such as *Astasia klebsii*, *Distigma proteus*, *Eutreptia* spp. and *Trachelomonas grandis*, the threads are double in structure, each consisting of two strands which lie side by side or coil around one another. In those species in which the

chromosomes obviously consist of paired chromatids in late anaphase and telophase (see later), the unorientated chromatin threads of the next prophase and early metaphase always appear double in structure.

As the endosome elongates, gaps in the hollow sphere of chromatin threads appear opposite its ends, at the poles of the division axis. This is the beginning of the orientation of the threads to their metaphase position. Movement of the threads continues until they have become orientated into a band around the endosome, the "metaphase" of euglenoid mitosis.

The circlet of threads (the "equatorial plate" of previous authors) is relatively narrow in *Colacium mucronatum*, *Euglena deses*, *Euglena gracilis*, *Euglena viridis*, *Peranema trichophorum*, *Phacus pyrum* and *Trachelomonas bulla* (Fig. 16), extending along the division axis for up to half the length of the endosome. The threads show some degree of orientation parallel to the division axis (Figs. 13, 15, 16 and 18). Close examination reveals that in no species do all the threads lie strictly parallel; there is always some haphazard coiling within the figure.

In *Distigma proteus*, *Euglena communis*, *Euglena spirogyra* and *Hyalophacus ocellatus* the band of threads is wider, the ends of the endosome protruding but a short distance beyond the chromatin. *Cryptoglena pigra*, *Lepocinclis ovum* var. *buetschlii* and *Phacus pusillus* have an extended cylinder of threads in metaphase along the full length of the long endosome. The tendency to a parallel arrangement is seen in these species, except in *Distigma proteus* where the threads coil haphazardly and, though in an equatorial band, never become parallel to the endosome in metaphase.

In *Eutreptia viridis* the metaphase arrangement is a wide cylinder of curving threads around the long, thin endosome (Fig. 19). The threads show little tendency to lie parallel to the endosome, the ends of which project some way beyond the chromatin. The metaphase arrangement is similar in *Eutreptia pertyi*, a larger species, and in *Trachelomonas grandis*. In *Astasia klebsii* the endosome never protrudes beyond the chromatin. In this one species there are always threads at the division poles, beyond the ends of the endosome.

The above descriptions refer only to the arrangement of the mass of chromatin threads at metaphase in the different species, without considering the condition of the individual threads, whether single or double, separating or separated. Observation of the living nucleus in division, with reference to stained preparations, has led me to the conclusion that orientation of the chromatin threads to the metaphase arrangement occurs in three ways.

(i) In *Astasia klebsii*, *Colacium mucronatum*, *Distigma proteus*, *Euglena acus*, *Euglena deses*, *Euglena spirogyra* and *Phacus pyrum*, the orientation

is of single threads from prophase into the metaphase circlet, still as single structures. Under anoptal contrast the threads appear beaded and are certainly sub-microscopically double. Microscopically, the threads are single chromosomes which duplicate into chromatids in their parallel position.

(ii) In *Cryptoglena pigra*, *Euglena gracilis*, *Lepocinclis ovum* var. *buetschlii*, *Peranema trichophorum* and partly in *Eutreptia* spp., the orientation is of visibly double threads from prophase or early metaphase (the latter having doubled during prophase), which separate as they orientate, so that the metaphase circlet is again of single threads. The difference from the first group is that these single threads are chromatids which have segregated towards the poles to which they will move in anaphase.

(iii) The third group of species is that in which orientation is of visibly double threads from prophase into a metaphase circlet, still as double structures, as pairs of chromatids. This occurs in *Euglena viridis*, *Eutreptia viridis* (partly), *Eutreptia pertyi* (partly), *Lepocinclis steinii* and *Trachelomonas grandis*.

Categories (i) and (iii) differ only in the time at which the double structure of the chromosomes becomes microscopically visible, (iii) being the nearest approach to the situation in "classical" mitosis. (ii) differs in the form of chromatid segregation and in its time relationship to the metaphase orientation. These categories have been established only for convenience of description and overlap to a certain extent in some species.

In most species there is no way of recognising individual chromosomes. In *Colacium mucronatum*, and less easily in *Phacus pyrum*, one chromosome can be distinguished by its relatively greater length. In both these species a single chromatid is seen extending towards each pole at metaphase (Fig. 15). At anaphase the end of the same chromatid lags behind the rest and is seen extending back to the equator from each group of chromatids.

6. Centromeres, spindle and nucleoplasm

One point of general agreement in the literature on nuclear division in the *Euglenineae* is that localised centromeres are absent. The possibility of a diffuse centromere or a polycentric structure has not previously been considered.

There is no visible, cytological evidence for the existence of localised centromeres. In no species are there constrictions or non-staining gaps in the metaphase or anaphase chromosomes or chromatids. The shapes of the anaphase chromatids (see later) could be related to known chromosome types. The U-shaped threads could be chromosomes with median

or sub-median centromeres; the straight threads could have terminal centromeres, or subterminal centromeres with one sub-microscopic chromosome arm.

However, neither constrictions nor gaps appear at the bends of the U-shaped threads, and sharp V-shapes are uncommon (if these predominated one might suppose a centromere was present at the angle, see CHEN 1948 for the *Opalinidae*). Chromatids often lie at an angle to the division axis and pass to the poles at this angle without becoming drawn out parallel to the axis. Finally, no spindle is present with which the localised centromeres could be associated.

Similarly, there is no structural or functional evidence for the chromosomes being polycentric.

In the absence of a spindle, there is no value in stipulating that the chromosomes have a diffused centromeric activity. The difficulties of understanding the passage of the chromatids to the poles, and the separation of the sister chromatids, are the same whether or not one labels the chromosomes as having diffuse centromeres.

Preliminary irradiation experiments have yielded no positive evidence, except of the great resistance of the euglenoid nucleus and chromosomes to X-rays and electrons (doses of 100,000 rad having no effect on the rate or structure of mitosis). If the chromosomes had single centromeres, any piece broken off by irradiation would be left behind at anaphase and perhaps left out of the daughter nuclei (assuming that the centromere was necessary for the anaphase movement). If the chromosomes were polycentric, much more break-up of the chromosomes would be needed before acentric fragments were obtained. If centromeres are absent, no amount of chromosome breakage would result in pieces being discarded at anaphase.

This kind of test will be extremely difficult to apply to the *Euglenineae*. The chromosomes are of varying lengths and so numerous that, unless they are completely shattered, breakages may pass unnoticed. The anaphase separation is staggered, and lagging chromatids occur regularly as a natural phenomenon (see later). The only criterion of an acentric fragment would be its failure to be incorporated in a daughter nucleus, and this might not occur owing to the presence of the nuclear membrane.

The nuclear membrane persists throughout mitosis, breaking only at telophase after the rupture of the elongated endosome. The mitosis is intranuclear.

The nuclear membrane is seen during mitosis in most species under anoptal contrast as a bright line separating the chromosomes from the cytoplasm. A narrow clear area exists between the chromosomes and the membrane, but the ends of the endosome usually touch the membrane in late anaphase. In stained preparations, the distinction between the

nucleoplasm and the cytoplasm is seen only as a difference in phase (Figs. 23 and 25).

The nucleoplasm immediately adjacent to the endosome, in which area lie the chromosomes, is denser than that immediately within the membrane. The consistency of this material around the chromosomes prevents flattening of the dividing nucleus by squashing. At no stage from late prophase until telophase can the chromosomes or chromatids be completely separated from one another. The nucleoplasm is just as dense during interphase, though the resting nucleus can be flattened out with the chromatin still in discrete threads after treatment with pepsin (Fig. 2). The nucleoplasm can in no way be regarded as a spindle, being an optically homogeneous matrix, containing neither "fibres" nor "lines of flow".

Further evidence that the type of spindle characteristic of "classical" mitosis is lacking comes from the shape of the dividing nucleus, with its broadly truncate ends, and from the duration of the mitotic stages. Anaphase lasts from 35 to 86 minutes in different species (LEEDALE 1958, detailed results on the timing of mitosis will be published later), as compared with 1 to 20 minutes in all other organisms and tissues for which records exist. The absolute velocity of the chromatids separating at anaphase is less than 0.1μ per minute at 20°C. , as compared with 0.3 to 6.0μ per minute for all other recorded material. It is suggested that the long anaphase and slow chromatid velocity are a reflection of a fundamentally different mitotic mechanism in which a spindle plays no part (see section IV, B).

Finally, colchicine has no inhibiting effect on any stage of the mitosis at any concentration from 0.001 to 4.0% . The form and rate of mitosis is not affected by this most efficient spindle inhibitor.

7. Chromosome duplication

Chromosome duplication is the subject of two major points of controversy in the study of nuclear division in the *Euglenineae*. Firstly there is the question of how the chromosomes "divide", secondly the question of when this "division" takes place.

(i) The method of chromosome duplication

Theories advanced on the method of chromosome duplication fall into three groups. The accounts are in terms of chromosome "cleavage" or "rupture", by which the authors meant the first visible separation between the chromatin elements destined for different daughter nuclei.

DANGEARD (1902, 1910, 1938) is the author of the "chromospire" theory. In this division of the euglenoid nucleus by "haplomitosis", individual chromosomes are absent, the chromatin being in the form of a

continuous spireme. In interphase the spireme coils about the endosome (Fig. 28A). During division the "chromospire" (gyres of the spireme) straighten to become arranged more or less parallel to the division axis and the elongated endosome (Fig. 28B). The "chromospire" then divide transversely at the division equator and the "knot" separates into two portions, each daughter nucleus receiving different parts of the spireme (Fig. 28C). DEHORNE (1920) has supported this theory and extended it to include other species.

The theory is unsatisfactory from a genetical view-point and is disproved cytologically by my observations. The individuality of the chromosomes and their longitudinal replication are no longer in doubt. It is profitless to enlarge upon the work of DANGEARD and DEHORNE in which they fit the "haplomitotic" form of nuclear division to many species. The work of these authors on the euglenoid nucleus must now be discounted.

The theories of the second group stipulate separate chromosomes, but ones which rupture transversely during nuclear division. Authors recording transverse chromosome cleavage include HARTMANN and CHAGAS (1910) for *Peranema trichophorum*, BĚLAŘ (1916) for *Astasia levis* (?), S. R. HALL (1931) for *Euglena leucops*, HALL and GOJDICS (1934) for *Euglena deses*.

The details of the processes described by these authors vary considerably, but, as they all base their conclusions on a false premise, only the main point of their interpretations will be discussed. This is that, during division, individualised chromosomes become arranged parallel to the elongated endosome (Fig. 28E, for a diagrammatic nucleus with two chromosomes) and break transversely (Fig. 28H), halves of each chromosome passing to opposite poles (Fig. 28I). The daughter nuclei thus receive different parts of the same chromosome.

The genetical consequences of this theory (or the "chromospire" theory of DANGEARD) were not considered by the authors concerned. Unless the gene arrangement in the euglenoid chromosome is non-linear, the transverse chromosome cleavage is hard to defend on genetical grounds. My observations on fixed and living dividing nuclei have shown that the idea of a transverse chromosome cleavage must also be rejected on cytological grounds. It is proved that chromosomes in the *Euglenineae* undergo longitudinal duplication.

The remaining theories vary on points of structural detail, chromosome arrangement, and time of cleavage, but all agree that during the nuclear division, individualised chromosomes divide longitudinally. These are considered in the next sub-section.

Obvious longitudinal duplication of the chromatin threads was first seen in the present study in *Eutreptia viridis*. Anoptral contrast micro-

scopy has shown that in this species the daughter chromosomes show a longitudinal doubling in anaphase, telophase, and through interphase to the next prophase. The double nature of the threads is best seen in the living cells but can be demonstrated in fixed, stained nuclei (Fig. 6). Observation of other species revealed a longitudinal duplication of the chromosomes at some stage of the mitotic cycle (Figs. 18 and 26).

In several species the double nature of the chromosomes was best seen at metaphase from the polar aspect. Stained cells of *Euglena spirogyra* with the nucleus in metaphase (recognised in side view) were rotated in the preparation to give a polar view. After careful differentiation it was seen that each metaphase chromosome consists of two longitudinally arranged chromatids (Fig. 18).

(ii) The time of chromosome duplication

The criterion for establishing the time of chromosome duplication must be the first microscopically visible appearance of a double structure. Chromosome replication may be occurring during the same period in the mitotic cycle in all species, but the pairs of chromatids are first seen at different stages.

The majority of authors describe chromosome "cleavage" (that is, the first separation of distinct chromatids) as "occurring" at prophase or metaphase, being functional for the same division. Prophase cleavage is recorded by BAKER (1926) for *Euglena "agilis"* (= *Euglena gracilis*), HALL and POWELL (1928) for *Peranema*, BROWN (1930) for *Peranema*, LOEFER (1931) for *Heteronema acus* (E.) Stein, and JOHNSON (1934) for *Colacium vesiculosum*. Metaphase cleavage is recorded by BLOCHMANN (1894), KEUTEN (1895), R. P. HALL (1937), KRICHENBAUER (1937) and HOLLANDE (1942), all for species of *Euglena*, and by HALL (1923), LACKEY (1934) and KRICHENBAUER (1937) for other genera. Metaphase cleavage is also, of necessity, recorded by proponents of the "chromospire" theory and theories involving the transverse rupture of chromosomes.

Cleavage during anaphase and telophase, functional at the subsequent mitosis, has been recorded only by TSCHENZOFF (1916), TANNREUTHER (1923) and RATCLIFFE (1927), all for species of *Euglena*.

It has been demonstrated in the present study that the daughter chromosomes at anaphase and telophase consist of pairs of distinct chromatids in *Euglena viridis* (agrees with TSCHENZOFF 1916), *Eutreptia viridis*, *Eutreptia pertyi* and *Trachelomonas grandis*. The chromatids usually coil around one another (Fig. 26).

A double structure has not been observed until prophase in *Cryptoglena pigra*, *Euglena gracilis*, *Lepocinclis ovum* var. *buetschlii* and *Peranema trichophorum*. In all these species, the chromatids segregate as orientation occurs to give the metaphase arrangement.

Chromosome duplication is first seen at metaphase in *Astasia klebsii*, *Colacium mucronatum*, *Distigma proteus* (agrees with LACKEY 1934), *Euglena acus*, *Euglena communis*, *Euglena deses* (agrees with KRICHENBAUER 1937), *Euglena spirogyra* (disagrees with RATCLIFFE 1927), *Lepocinclis steinii* and *Phacus pyrum* (agrees with KRICHENBAUER 1937). The duplication is clearly seen with anoptal contrast, its demonstration in stained preparations is more difficult.

8. The separation of sister chromatids

Chromatid separation is related to the method of chromosome "cleavage" in the accounts of previous authors. Workers recording transverse cleavage of a spireme or chromosomes had no difficulty here, as the transverse break itself separated the "chromatids", or rather non-homologous spireme or chromosome parts, after which they passed to the poles.

Of the authors who correctly describe the chromosome duplication as longitudinal, most make no attempt to describe the separation of chromatids or their passage to opposite poles. Of the remainder, KRICHENBAUER (1937) and HOLLANDE (1942) describe parallel chromatid separation. In Fig. 28, this is shown diagrammatically for a nucleus with two chromosomes. The chromosomes pass from the resting condition (Fig. 28D) into metaphase (Fig. 28E) where longitudinal duplication "occurs" (Fig. 28F). The chromatids then separate by "gliding against one another in opposite directions" (Fig. 28G) and pass to the poles (Fig. 28H and L).

It is difficult to suggest a mechanism which could cause such a movement. HOLLANDE (1942) admits this difficulty but severely criticises the work of R. P. HALL and his colleagues: "animated by a desire to arrive at a scheme which conforms to normal mitoses" (translation).

R. P. HALL (1923), BAKER (1926), RATCLIFFE (1927), HALL and POWELL (1928), BROWN (1930), LOEFER (1931), LACKEY (1933, 1934) and JOHNSON (1934) record that chromatid separation begins in early metaphase (Fig. 28I), metaphase being characterised by a parallel arrangement of elongated V-shapes (Fig. 28K). Separation begins at one end of the chromosome and progresses uniformly to the other. The free arms come to point to the poles (Fig. 28K) and as separation completes (Fig. 28H) sister chromatids are in the correct position for passing to opposite poles. HALL has re-described this process diagrammatically (1937) but has failed to consider the arguments against his interpretation.

The regular metaphases, in which the many chromatin threads are all arranged as elongated V's parallel to the endosome, do not occur and it is evident from the range of metaphase structure described in the present paper that HALL has been misled into simplification by examining only one or two species.

My early observations suggested that HALL's theory was closest to the actual process of chromatid separation in the euglenoid nucleus. It appeared that chromatid separation occurred in late prophase and early metaphase *over a period of time*, such that most pairs were completely separate by the time the metaphase circlet was produced. This staggering of chromatid separation would account, in part, for the complicated mitotic figures, with parallel and non-parallel threads. It is easier to visualise an autonomous movement of chromatids to the poles when the sister chromatids never lie side by side, parallel to the division axis. In this latter position, before "parallel displacement", the sister chromatids would be subject to equal forces acting in relation to the poles. Why one chromatid of a pair should move in one direction and the other in the opposite direction has not been explained by KRICHENBAUER or HOLLANDE.

As indicated earlier, my early interpretation is correct for *Cryptoglena pigra*, *Euglena gracilis*, *Lepocinclis ovum* var. *buetschlii* and *Peranema trichophorum*. Sister chromatids of different pairs separate at different times during early metaphase. At metaphase only a few of the chromatids are still associated in pairs (Fig. 14). Most chromatids separate from their homologue along their full length, but some transient V-shapes are formed.

It is now clear that the method of chromatid separation is not identical in all species. The parallel arrangement described by KRICHENBAUER (1937) and HOLLANDE (1942) does occur in a number of species. In *Astasia klebsii*, *Colacium mucronatum*, *Distigma proteus*, *Euglena acus*, *Euglena communis*, *Euglena deses*, *Euglena spirogyra*, *Lepocinclis steinii* and *Phacus pyrum*, single chromosomes become double at metaphase, lying more or less parallel to the division axis (Fig. 18). A comparison of the thickness of the elements makes it clear that those passing to the poles in anaphase are single chromatids, equal in thickness to one of the two sister chromatids of any metaphase pair. Separation of sister

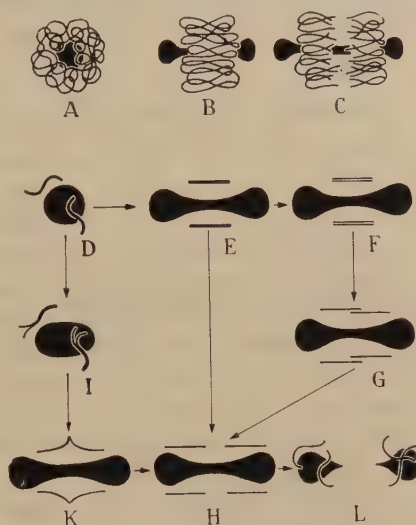


Fig. 28. Theories of chromosome cleavage in the *Euglenineae*. A—C. The "chromospire" theory of DANGEARD (1902, 1910, 1938) and DEHORNE (1920). D. A diagrammatic resting nucleus with two chromosomes. D, E, H, L. Transverse chromosome cleavage. D, E, F, G, H, L. Longitudinal chromosome cleavage with "parallel displacement" in anaphase (G). D, I, K, H, L. Longitudinal chromosome cleavage with chromatid separation from one end. For further details, see text.

chromatids does not occur gradually from one end, there is no formation of transient V-shapes. Mutual repulsion between sister chromatids deflects them outwards and finally into different nuclei (see section IV, B).

In *Euglena viridis*, *Eutreptia viridis*, *Eutreptia pertyi* and *Trachelomonas grandis*, chromosome duplication is first seen in the previous anaphase or telophase. The prophase chromatin consists of pairs of chromatids and these separate and segregate as they orientate during metaphase (*Eutreptia* spp., Fig. 19), or after orientation, in metaphase.

9. Anaphase movement of the chromatids

During the early anaphase movement of the chromatids the endosome is not elongating. In the early stages of anaphase, at least, the endosome does *not* have the function of carrying apart the chromatids.

Segregation of the chromatids is staggered. The two groups of chromatids do not move to the poles as "anaphase plates", as they do in higher organisms. This is a further indication that a spindle is lacking. Some chromatids move early to the poles, reaching the ends of the endosome whilst most of the threads are still at the equator. In some cases separated chromatids reach the poles whilst others are still associated in homologous pairs; here chromatid separation is also staggered (Fig. 14).

A general anaphase movement follows the early-moving chromatids and a complete spread of chromatids from equator to poles is seen (Figs. 20 and 21). At late anaphase most chromatids have reached the poles, a few still remain at the equator (Figs. 24 and 27). These lagging chromatids finally reach the poles and are incorporated into the daughter nuclei.

This general account of the anaphase migration of the chromatids applies to most of the species examined in the present study, including *Colacium mucronatum*, *Cryptoglena pigra*, *Distigma proteus*, *Euglena* spp., *Eutreptia* spp., *Hyalophacus ocellatus*, *Lepocinclis* spp., *Phacus* spp., *Strombomonas verrucosa* var. *conspersa* and *Trachelomonas grandis*.

In *Euglena deses*, *Peranema trichophorum* and *Trachelomonas bulla*, the early anaphase movement is more regular, the groups of chromatids separating evenly and showing a well-marked central gap (see Fig. 16). In *Astasia klebsii* the chromatids separate as the nucleus passes into metaphase, sister chromatids passing to opposite poles. At metaphase the endosome is enveloped in threads, some of which may still be double. When the endosome elongates, the segregated chromatids are carried apart as a cap over each of its ends.

During late metaphase and anaphase the chromatids assume one of four shapes. All four may occur in one species but one or two shapes

usually predominate, depending mainly on the length of the chromosomes. Anaphase chromatids may be straight rods, parallel to the division axis or at an angle to it (Fig. 29A); curving threads, along or across the division axis (Fig. 29B); U-shaped with the bend of the loop at the equator, the free arms pointing to the pole (Fig. 29C); or U-shaped with the free arms at the equator, the bend of the loop pointing to the pole (Fig. 29D). U-shapes are usually assumed by the longer chromatids.

All species have some chromatids which pass to the poles as straight rods and most have some which curve and loop to a slight extent (Figs. 13, 14, 21, 24 and 27). U-shapes with the curve at the equator occur in *Colacium mucronatum* and *Pernema trichophorum* (Fig. 16). U-shapes with the curves towards the poles are common in *Eutreptia pertyi*, *Trachelomonas bulla* and *Trachelomonas grandis* (Fig. 22), and are seen in *Eutreptia viridis*, *Euglena deses*, *Euglena spirogyra* and *Menoidium cultellus*. In *Astasia klebsii* the chromatids appear single or V-shaped and are arranged around the ends of the endosome in anaphase, with the bend of the V pointing towards the endosome (Fig. 29E).

In most species the chromatids are still filamentous at late anaphase. The return of the chromatin to a granular appearance, in those species where the interphase chromatin appears granular, usually occurs during reconstitution following telophase. In *Euglena acus* and *Euglena gracilis* the chromatids become granular in anaphase as they move to the poles (Fig. 25).

C. Telophase

The end of anaphase is marked by the disappearance of the central region of the elongated endosome. The nuclear membrane persists around the two groups of chromatids and apparently closes between these as the endosome "breaks". The inner surfaces of the nuclear membrane presumably meet in the mid-region of the elongated nucleus, the ensuing rupture of the membrane being followed by an immediate sealing around the now separate daughter nuclei. These assume the spherical or oval shape typical of the interphase nucleus.

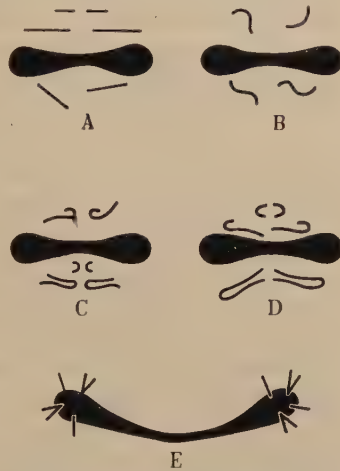


Fig. 29. Chromatid shapes during mitotic anaphase in the *Euglenineae*. The dividing endosome is also shown. A. Rods. B. Curving threads. C. U-shapes to the equator. D. U-shapes to the poles. E. Rods and V-shapes radiating from the ends of the endosome

Migration of the telophase nuclei to the interphase position occurs, either to the centre or posterior end of the cell. In most species, cell cleavage begins at this stage; in *Astasia klebsii*, *Distigma proteus* and *Menoidium cultellus*, cell cleavage begins prior to telophase.

The daughter chromosomes of the telophase nuclei appear single in most species, but in *Euglena viridis*, *Eutreptia* spp., and *Trachelomonas grandis* they are already duplicated into the sister chromatids of the next mitosis (Fig. 26). The endosome(s) is conical in shape, with an inwardly-pointing narrow end, a legacy from the dumbbell-shaped dividing endosome. During nuclear reconstitution the endosome rounds off and, in certain species, fragments into a number of bodies.

IV. Discussion

A. Mitosis or not?

Having compared my observations on nuclear division in the *Euglenineae* with the accounts of the same process given by previous authors, the comparison must now be extended to consider the relationship between this process and the mitosis of other organisms, and to whether or not the euglenoid nuclear division is a true mitosis.

"In mitosis the mother nucleus resolves itself into a number of double bodies; the chromosomes, whose halves separate to form two daughter nuclei which are exactly equivalent, and all the descendants of a nucleus derived in this way have the same complement of chromosomes" (DARLINGTON 1937). The "essential feature (of mitosis) is the duplication and orderly segregation of the whole set of chromosome individuals of a given nucleus" (ROBINOW 1956).

On the basis of these definitions there can be no doubt that in the *Euglenineae* the nucleus divides by a mitotic process. It has been shown in the preceding pages that individualised chromosomes duplicate themselves, and that the daughter chromosomes segregate to opposite poles and into different daughter nuclei.

The mitosis differs from that in higher organisms in the persistence and division of the endosome; the retention of ribonucleic acid by the endosome; the absence of spindle and centromeres; the arrangement of the chromosomes parallel to the division axis at metaphase and the absence of a true equatorial plate; the staggering of separation and segregation of chromatids in some species; the staggering of anaphase chromatid migration; the long duration of the anaphase; the slow chromatid velocity at anaphase; and the retention of the nuclear membrane.

In a few species of *Euglena* the nucleus can also divide by amitosis (LEEDALE, in preparation), a direct division of the nucleus without orientation and orderly segregation of chromosome sets. Such a nuclear fragmentation is not functional in reproduction.

GRELL (1953) has suggested that a system of "genome segregation", such as he has proposed for *Aulacantha scolymantha* (Radiolaridae), operates in the *Dinophyceae* and *Euglenineae*, believing that in both groups a mass of randomly distributed threads separates into two portions by nuclear constriction during nuclear division. These threads are double and are interpreted by GRELL as sister genomes rather than as paired chromatids.

My observations have shown that his concept cannot be applied to the *Euglenineae*. In this group, sister chromatids segregate to opposite poles during nuclear division. In some species the threads in anaphase and telophase are double, but these threads are chromatids which have segregated in metaphase, already revealing the duplication into the chromatids which will be functional at the *next* mitosis. In many species the chromosomes are obviously non-homologous, being of different lengths. In species where there is one long chromosome (*Colacium mucronatum*, *Phacus pyrum*), the sister chromatids can be recognised in anaphase and are seen passing to opposite poles.

B. The mechanism of euglenoid mitosis

HOLLANDE (1942) has interpreted the euglenoid mitosis as a passive stretching of both the "nucleolus" and the mass of chromatids. He points out that in higher plants, where centrioles are also absent, separation of chromatids is by repulsion at the level of the centromeres "fixing" the chromatids to the spindle; in the *Euglenineae* there are neither centromeres nor spindle fibres. He makes no attempt to explain how the "passive stretching" occurs.

The change in polarity within the nucleus during mitosis occurs at different times in the endosome and chromatin. During prophase and early metaphase, the endosome elongates towards the poles, whilst the chromatin is moving towards the *centre* of the nucleus where it becomes arranged in a band around the endosome. During late metaphase and early anaphase, the endosome ceases to elongate and the polarity within the nucleus changes so that the chromatin separates into two groups of chromatids which move to the poles. In late anaphase the ends of the endosome, with their associated groups of chromatids, move further apart.

It is tempting to cite the anterior migration of the nucleus as evidence for an association with the flagellar apparatus. If there is no such association, why does the nucleus move to the anterior of the cell during prophase in all species? Why not assume that the basal granules of the flagella act as division centres, operating at opposite ends of the nucleus to alter its polarity and cause mitosis?

The structural evidence does not support such speculations: the position of the nucleus in the cell is too variable in the different species;

the basal granules do not appear in the required constant positions relative to the nucleus during mitosis; and mitosis is *structurally* in progress as the nucleus is moving towards the cell anterior. It may be that the prophase migration of the nucleus is a relic from what was once a division controlled by the flagellar apparatus. If so, species may yet be found in which the basal granules of the flagella are true blepharoplasts.

The present observations of nuclear structure during mitosis have shown that there is no evidence for the presence of centrioles or centrosomes in the *Euglenineae*, the basal granules of the flagella do not act as division centres, the endosome is a passive body, there is no spindle, and there are no centromeres.

The conclusion is that the endosome divides and the daughter chromosomes move apart in an autonomous manner, their movement being governed only by their mutual repulsion. Chromatid repulsion begins in metaphase and leads to anaphase. In some species, repulsion follows closely on chromosome duplication; in others, sister chromatids attract one another throughout interphase.

Such a repulsion will account for the several forms of chromatid separation, by starting at different stages of the division process in different species, and by either beginning at one end of the double chromosome or occurring uniformly throughout its length.

A continuous repulsion between sister chromatids will ensure their incorporation into different daughter nuclei, even where they at first lie side by side in metaphase, as the chromatin elements are moved within the nucleus by cell metaboly.

The presence of the nuclear membrane results in the repelling chromatids becoming marshalled into two groups. As these move apart, the nuclear membrane becomes stretched by the two groups and finally meets between them to separate the nuclear material into two daughter nuclei which are cytologically and genetically identical. The spindle of "classical" mitosis ensures the continued association of the daughter chromosomes of each anaphase group until the daughter nuclei are formed. In the *Euglenineae*, it seems that this function is performed in a different way by the persistent nuclear membrane, the dense nucleoplasm and the nuclear membrane preventing a scattering in the cell of the repelling chromatids.

The orientation of the division axis is possibly governed by the anterior-posterior polarity of the cell and cell-symmetry. There is no cytochemical or experimental evidence which might indicate the possible biophysical or biochemical basis of the chromatid repulsion.

To summarise: this theory accounts for the various forms of chromatid separation; it is independent of division centres, spindle or centromeres; it is dependent on the retention of the nuclear membrane during mitosis;

the long duration of anaphase and the slow chromatid velocity are consequent on the different mitotic mechanism, as are the complicated division figures, the "staggered" anaphase, and the several chromatid shapes within one dividing nucleus. The theory fits all observed structures and conflicts with none.

Summary

1. Nuclear structure and division have been examined in 24 species of the *Euglenineae*, drawn from 13 genera.

2. The interphase nucleus is spherical, ovoid or elongated, and lies in the centre or posterior half of the cell. It contains one, two or several endosomes. The chromatin may appear granular or filamentous but is basically filamentous in structure; the chromosomes appear single or double in different species.

3. Despite anterior migration of the nucleus during prophase, there is no structural relationship between the nucleus and the flagellar apparatus. The basal granules do not act as division centres, and rhizoplasts are absent. There is no evidence for the presence of intra- or extra-nuclear centrioles or centrosomes.

4. The endosome elongates along the division axis during mitosis and divides to form the endosomes of the daughter nuclei. Endosome material usually divides as a single body; in a few species the several endosomes do not fuse but divide separately. Endosomes are similar to nucleoli in their shape and position, their staining and negative Feulgen reaction, their fusion and fragmentation, and in containing ribonucleic acid. They differ from nucleoli in their persistence and division during mitosis, their retention of ribonucleic acid, and the apparent absence of nucleolar-organising chromosomes.

5. There is no structural evidence for the presence of a spindle. Evidence for its absence is provided by the shape of the dividing nucleus, the lack of effect of colchicine, the absence of centromeres, the staggering of anaphase movement, the long duration of anaphase, and the slow chromatid velocity during anaphase.

6. Orientation of the chromatin to the metaphase arrangement occurs in three ways: chromosomes from prophase into a circlet of chromosomes, with duplication and segregation in metaphase; pairs of chromatids from prophase into a circlet of single chromatids, segregation occurring during orientation; pairs of chromatids from prophase into a circlet of such pairs, with segregation in metaphase.

Chromosome duplication is longitudinal, occurring in prophase, metaphase, anaphase or telophase. Theories of transverse cleavage of a spireme or chromosomes must be abandoned.

Separation, segregation and anaphase movement of the chromatids is staggered, some chromatids reaching the poles whilst others are still at the equator. There are four chromatid shapes during anaphase: straight rods, curving threads, U-shapes towards the division equator, and U-shapes towards the poles.

7. Nuclear division in the *Euglenineae* is a true mitosis in that individualised chromosomes duplicate themselves longitudinally and sister chromatids segregate to opposite poles.

In the absence of centrioles, centrosomes, blepharoplasts, centromeres and spindle, it is suggested that endosome division and chromatid movement are autonomous, with mutual repulsion between sister chromatids to opposite poles. The dense nucleoplasm and the retention of the nuclear membrane during mitosis will prevent a scattering of the chromatids in the cell. The nuclear membrane will be stretched as the two groups of repelling chromatids move apart; separation to two cytologically and genetically equivalent nuclei will finally occur. Such a mechanism accounts for the complicated mitotic figures, the staggered anaphase, the parallel and nonparallel chromosomes, and the range of chromatid shapes.

Acknowledgements: My grateful thanks are due to Dr. M. B. E. GODWARD of Queen Mary College, University of London, and to Prof. Dr. E. G. PRINGSHEIM of the University of Göttingen, for their invaluable advice and encouragement during the course of my research; to Prof. Dr. E. G. PRINGSHEIM, Mr. E. A. GEORGE of the Cambridge Culture Collection of Algae and Protozoa, and Prof. H. C. BOLD of the University of Texas, for sending me cultures of species of the *Euglenineae*; to Mr. P. HOWARD-FLANDERS of the M. R. C. Radiopathology Unit for irradiating material for me; and to the Central Research Fund of the University of London for grants enabling me to visit the Universities of Göttingen and Cambridge.

Literature

ALEXEIEFF, A.: Haplomitose chez les Eugléniens et dans d'autres groupes de protozoaires. C.R. Soc. Biol. (Paris) **71**, 614—617 (1911). — Systématisation de la mitose dite „primitive“. Arch. Protistenk. **29**, 344—363 (1913).

BAKER, W. B.: Studies on the life history of *Euglena*, I: *Euglena agilis* Carter. Biol. Bull. **51**, 321—362 (1926). — BĚLAŘ, K.: Protozoenstudien I. Arch. Protistenk. **36**, 13—51 (1916). — Der Formwechsel der Protistenkerne. Ergebn. Fortschr. Zool. **6**, 235—654 (1926). — BERLINER, E.: Flagellatenstudien. Arch. Protistenk. **15**, 297—326 (1909). — BLOCHMANN, F.: Über die Kernteilung bei *Euglena viridis*. Biol. Zbl. **14**, 194—197 (1894). — BRACHET, J.: La détection histochemique des acides pentosenucléiques. C.R. Soc. Biol. (Paris) **133**, 88—90 (1940). — The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. Quart. J. micr. Sci. **94**, 1—10 (1953). — BRETSCHNEIDER, L. H.: Über den feineren Bau von *Phacus costata* Conrad. Arch. Protistenk. **53**, 131—134 (1925). — BROWN, V. E.: Cytology and binary fission of *Peranema*. Quart. J. micr. Sci. **73**, 405—419 (1930). — BROWN, W. V., and W. H. P. EMERY: Persistent nucleoli and grass systematics. Amer. J. Bot. **44**, 585—590 (1957).

CALKINS, G. N.: "The Biology of the Protozoa", Lea and Febiger, Philadelphia 1926. — CHADEFAUD, M.: L'infrastructure du protoplasme et du caryoplasme

d'après l'étude des Euglènes. Arch. exp. Zellforsch. **22**, 483—486 (1939). — CHATTON, E.: Essai sur la structure du noyau et la mitose chez les Amœbiens, faits et théories. Arch. Zool. exp. gen. V. S. **5**, 267—337 (1910). — CHEN, T.-T.: Chromosomes in Opalinidae (Protozoa, Ciliata) with special reference to their behaviour, morphology, individuality, diploidy, haploidy, and association with nucleoli. J. Morph. **83**, 281—358 (1948). — CHU, S. P.: Contributions to our knowledge of the genus *Euglena*. Sinensia **17**, 75—134 (1947).

DARLINGTON, C. D.: "Recent Advances in Cytology", 2nd Edn, Churchill, London 1937. — DANGEARD, P. A.: Recherches sur les Eugléniens. Botaniste **8**, 97—357 (1902). — Études sur le développement et la structure des organismes inférieures. Botaniste **11**, 1—311 (1910). — Mémoire sur la famille des Péridiniens. Botaniste **29**, 3—182 (1938). — DEHORNE, A.: Contribution à l'étude comparée de l'appareil nucléaire des Infusoires ciliés, des Euglènes et des Cyanophycées. Arch. Zool. exp. gen. **60**, 47—176 (1920). — DOBELL, C. C.: The structure and life-history of *Copromonas subtilis*, nov. gen. et nov. spec.: a contribution to our knowledge of the Flagellata. Quart. J. micr. Sci. **52**, 75—120 (1908). — DOFLEIN, F.: Lehrbuch der Protozoenkunde, 4. Aufl. Fischer, Jena 1916. — DREZEPOLSKI, R.: L'évolution du noyau et son rôle chez les Euglènes, Ann. Protistol. **2**, 109—118 (1929).

GIMESI, N.: Die Geburt von *Trachelomonas volvocina* Ehrb. Arch. Protistenk. **72**, 190—197 (1930). — GOJDICS, M.: The cell morphology and division of *Euglena deses* Ehrbg.. Trans. Amer. micr. Soc. **53**, 299—310 (1934). — "The Genus *Euglena*", Univ. of Wisconsin Press, Madison 1953. — GRELL, K. G.: Die Chromosomen von *Aulacantha scolymantha* Haeckel. Arch. Protistenk. **99**, 1—54 (1953). — GÜNTHER, F.: Über den Bau und die Lebensweise der Euglenen, besonders der Arten *E. terricola*, *geniculata*, *sanguinea* und *lucens* nov. spec. Arch. Protistenk. **60**, 511—590 (1928).

HAASE, G.: Studien über *Euglena sanguinea*. Arch. Protistenk. **20**, 47—59 (1910). — HALL, R. P.: Morphology and binary fission of *Menoidium incurvum* (Fres.) Klebs. Univ. Calif. Publ. Zool. **20**, 447—476 (1923). — A note on the behaviour of the chromosomes in *Euglena*. Trans. Amer. micr. Soc. **56**, 288—290 (1937). — HALL, R. P., and T. L. JAHN: On the comparative cytology of certain euglenoid flagellates and the systematic position of the families Euglenidae Stein and Astasiidae Bütschli. Trans. Amer. micr. Soc. **48**, 388—405 (1929). — HALL, R. P., and W. N. POWELL: Morphology and binary fission of *Peranema trichophorum* (Ehrbg.) Stein. Biol. Bull. **54**, 36—65 (1928). — HALL, S. R.: Observations on *Euglena leucops* n. spec., a parasite of *Stenostomum*, with special reference to nuclear division. Biol. Bull. **60**, 327—334 (1931). — HARTMANN, M., and C. CHAGAS: Flagellaten-Studien. Mem. Inst. Osw. Cruz. **2**, 64—125 (1910). — HARTMANN, M., and S. VON PROWAZEK: Blepharoplast, Caryosom und Centrosom. Arch. Protistenk. **10**, 306—333 (1907). — HOLLANDE, A.: Quelques données nouvelles sur la cytologie d'une Astasiacée peu connue: *Distigma proteus* Ehrb. Bull. Soc. zool. Fr. **62**, 236—241 (1937). — Étude cytologique et biologique de quelques flagellés libres. Arch. Zool. exp. gen. **83**, 1—268 (1942). — HUBER-PESTALOZZI, G.: Das Phytoplankton der Binnengewässer, 4. Eugleninen, Stuttgart 1955.

JAHN, T. L.: The euglenoid flagellates. Quart. Rev. Biol. **21**, 246—274 (1946). — JIROVEC, O.: Protozoenstudien I u. II. Arch. Protistenk. **56**, 280—290, **59**, 550—561 (1926, 1927). — JOHNSON, D. F.: Morphology and life-history of *Colacium vesiculosum* Ehrenberg. Arch. Protistenk. **83**, 241—263 (1934).

KARL, I.: Über die Kernteilung der Euglenen vom Typus *viridis*. Bot. Közl. **14**, 136—144 (1915). — KEUTEN, J.: Die Kernteilung von *Euglena viridis*. Z. wiss. Zool. **60**, 215—235 (1895). — KRICHENBAUER, H.: Beitrag zur Kenntnis der Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Gattungen *Euglena* und *Phacus*. Arch. Protistenk.

90, 88—123 (1937). — KUHN, A.: Über den Bau, Teilung und Encystierung von *Bodo edax* Klebs. Arch. Protistenk. **35**, 212 (1915).

LACKEY, J. B.: Studies on the life histories of Euglenida, I. The cytology of *Entosiphon sulcatum* (Duj.) Stein. Arch. Protistenk. **66**, 176—200 (1929). — III. The morphology of *Peranema trichophorum* Ehrb., with special reference to its kinetic elements and the classification of the Heteronemidae. Biol. Bull. **65**, 238—248 (1933). — IV. A comparison of the structure and division of *Distigma proteus* Ehrb. and *Astasia Dangeardi* Lemm. A study in phylogeny. Biol. Bull. **67**, 145—162 (1934). — LEEDALE, G. F.: Mitosis and chromosome numbers in the Euglenineae (Flagellata). Nature **181**, 502—503 (1958). — LOEFER, J. B.: Morphology and binary fission of *Heteronema acus* (Ehrb.) Stein. Arch. Protistenk. **74**, 449—470 (1931).

MAINX, F.: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Eugleninen, I a. II. Arch. Protistenk. **60**, 305—414 (1927). — MINCHIN, E. A.: "An Introduction to the Study of the Protozoa", London 1912.

PRINGSHEIM, E. G.: "Pure Cultures of Algae", Cambridge Univ. Press. 1946 a. — The biphasic or soil-water culture method for growing algae and flagellata. J. Ecol. **33**, 193—204 (1946 b). — Taxonomic problems in the Euglenineae. Biol. Rev. **23**, 46—61 (1948). — Contributions towards a Monograph of the Genus *Euglena*. Nov. Acta Leopold. **18**, 1—168 (1956). — PROWAZEK, S. VON: Die Kernteilung des *Entosiphon sulcatum*. Arch. Protistenk. **2**, 325—328 (1903).

RATCLIFFE, H. L.: Mitosis and cell division in *Euglena spirogyra* Ehrenberg. Biol. Bull. **53**, 109—122 (1927). — ROBINOW, C. F.: The chromatin bodies of *Bacteria*. Bact. Rev. **20**, 207—242 (1956).

SCHÜSSLER, H.: Zytologische und entwicklungsgeschichtliche Protozoenstudien. I. Teilung von *Scytomonas pusilla* Stein. Arch. Protistenk. **38**, 117—125 (1917). — STEUER, A.: Über eine Euglenoide (*Eutreptia*) aus dem Canale Grande von Triest. Arch. Protistenk. **3**, 126—137 (1904).

TANNREUTHER, G. W.: Nutrition and reproduction in *Euglena*. Arch. Entw.-Mech. Org. **52**, 367—383 (1923). — TSCHENZOFF, B.: Die Kernteilung der *Euglena viridis* Ehrenberg. Arch. Protistenk. **36**, 137—173 (1916).

UNNA, P. C.: Mschr. prakt. Dermat. **35**, 76 (1902).

WENRICH, D. H.: Studies on *Euglenamorphia hegneri* n. g., n. sp., a euglenoid flagellate found in tadpoles. Biol. Bull. **47**, 149—175 (1924).

ZUMSTEIN, H.: Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. Jb. wiss. Bot. **34**, 149—198 (1900).

(Aus dem Institut für spez. Botanik der Friedr. Schiller-Universität Jena)

Karyologische Untersuchungen an einer Wildhefe

Von

BARBARA ECKSTEIN, Jena

Mit 36 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Oktober 1957)

Seit 1845 SCHLEIDEN von der Existenz eines Zellkernes bei den Hefen berichtet hatte und KRASSER 1885 sowie RAUM 1891 keinen Kern finden konnten, wurde das Problem der Existenz und der Teilung des Hefezellkernes immer wieder aufgegriffen. Namen wie JANSSENS, GUILLIERMOND, WAGER u. PENISTON, KATER, aus neuester Zeit WINGE, LINDEGREN, DE LAMATER und viele andere sind damit verbunden. Und dennoch existiert bis heute noch kein klares Bild über den Vorgang der vegetativen Teilung, weil die Untersuchungen durch die Kleinheit der Zelle und ihres Kernes sehr erschwert werden. Außerdem färbt sich das häufig in reichem Maße in den Zellen vorkommende Metachromatin oder Volutin mit den meisten Kernfärbemethoden ebenfalls stark an, was sich für die Beobachtung des Kernes störend bemerkbar macht. Demzufolge war die Ansicht, daß bei der vegetativen Teilung der Hefen eine Amitose vorliege, weit verbreitet und galt lange Zeit als gesichert, zumal sie vor allem von Autoritäten wie GUILLIERMOND vertreten wurde. In einer seiner letzten Arbeiten (1936) weist GUILLIERMOND aber bereits darauf hin, daß er eine an die Mitose der Ustilagineen erinnernde Kernteilung bei einer Hefe beobachtet habe.

Auch über den Ort des Zellkernes und seine Bestandteile besteht keine Übereinstimmung. Von den Vertretern der „Kernvacuolentheorie“ wird die in den Hefezellen immer vorhandene Vacuole als Hauptbestandteil des Zellkernes genannt, wie z. B. von JANSSENS (1898), WAGER u. PENISTON (1910) sowie LINDEGREN (1949, 1953, 1954, 1956). Sie bezeichnen den eigentlichen Kern als „nucleole nucleinien“, Nucleolus, Centrosom oder sogar als „Spindel“. Hierbei ist bemerkenswert, daß gerade LINDEGREN an seinem erst Centrosom, dann Spindel genannten Kernbestandteil stark an eine echte Mitose gemahnende Teilungsvorgänge beschreibt.

Andere, wie z. B. SWELLENGREBEL (1905), KATER (1928), FUHRMANN (1906) und NAGEL (1946) erkennen bereits den wirklichen Zellkern, doch nie konnten sie einen ganzen Mitosecyclus verfolgen. Immer wurde nur ein gerade gut zu erkennendes Einzelstadium besonders klar beobachtet,

und das Erfassen des ganzen Vorganges blieb unsicher und lückenhaft. Noch die neuesten Arbeiten von DE LAMATER (1955) und LINDEGREN (1956) bringen kein übereinstimmendes Ergebnis. LINDEGREN ist trotz weitgehender Erkenntnisse noch immer Anhänger der Kernvacuolentheorie und die von DE LAMATER geschilderten Kernteilungsvorgänge lassen sich leider an den stark vergrößerten Photographien nicht verfolgen. Aus diesem Grunde regte Herr Prof. Dr. SCHUSSNIG zu einer nochmaligen Bearbeitung des Problemes an.

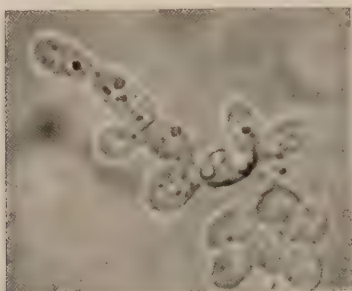


Abb. 1

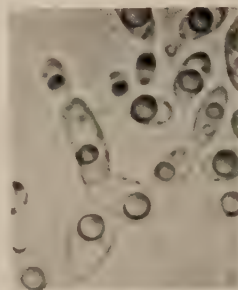


Abb. 2

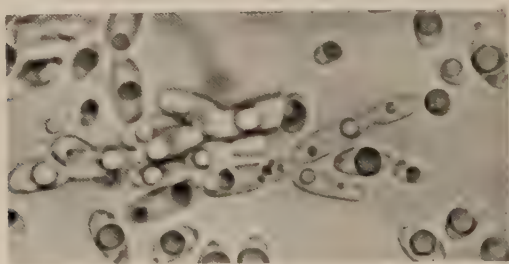


Abb. 3

Abb. 1—3. Kartoffelagar-Kultur, Hellfeldaufnahme. Vergr. 1100

Artbeschreibung

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine Wildhefe verwendet, welche im März 1956 aus Pelose — einem therapeutisch verwandten Heilschlamm aus Schollene (Mecklenburg) — isoliert worden war.

Bei einer Überprüfung ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften entsprechend den Angaben aus dem Standardwerk „The Yeasts“ von LODDER u. KREGER-VAN RIJ ergab sich, daß es sich um eine nichtsporenbildende Form aus der Fam. der *Cryptococcaceae* handelt. Als positive Merkmale stellten sich eine Sedimentbildung, eine Ringbildung, Assimilation von Glucose, Saccharose, Maltose, Galaktose und Nitrat heraus. Pseudomycelentwicklung, Sporenbildung, Assimilation von Lactose, Gärvermögen, Fettspaltung, Säurebildung und alle anderen Eigenschaften erwiesen sich als negativ.

Bei 25° C auf Malzagar gezogene Zellen sind oval bis länglich-oval, 5,5—13,5 μ lang und 4—6 μ breit, durchschnittlich etwas länger als die in Malzwürze gewachsenen. 4—6 Wochen alte Strichkulturen sind hellbraun bis cremefarben, glatt, glänzend, am Rande leicht faltig und gelappt.

Nach dem im taxonomischen Teil des genannten Werkes angegebenen Bestimmungsschlüssel konnte die Wildhefe zu der Unterfamilie der *Cryptococcoideae* gerechnet werden. Wie mir Frau N. J. W. KREGER-VAN RIJ (Delft, 1958) freundlicherweise mitteilte, handelt es sich um eine *Candida scottei* nahe verwandte oder mit dieser identische Form. Abb. 1—5 stellen die Hefe im unfixierten Zustand dar, um einen Eindruck von ihrem vegetativen Habitus zu vermitteln. Abb. 1—3 zeigen auf einem Objektträger in Kartoffelagar gezogene Kulturen. Dabei tritt die unter diesen Bedingungen zu beobachtende schwache Sproßkettenbildung in Erscheinung. Pseudomycelien werden nicht entwickelt. Auf Abb. 1 und 2 sieht man außerdem die äußerst



Abb. 4



Abb. 5

Abb. 4, 5. Würzeagar-Kultur, Dunkelfeldaufnahme. Vergr. 3100

selten eintretende Querwandbildung. Dabei sind die Zellen auf Abb. 1 neben dem Deckglas gewachsen, rundlich oval und enthalten viele kleine stark lichtbrechende Öltröpfchen, während die Zellen von Abb. 2 und 3, unter dem Deckglas gewachsen, länglich oval sind und 1—2 große Öltröpfchen besitzen. In allen Fällen wurden 4 Tage alte Kulturen abgebildet. Abb. 4 und 5 stellen Dunkelfeldaufnahmen von Zellen aus 3 Tage alten auf Würzagar gewachsenen Hefen dar. Immer tritt die bereits in jungen Kulturen stark auftretende Öltröpfchenbildung in Erscheinung.

Technisches

Die vorliegende Wildhefe stellt, dank den verhältnismäßig großen Zellen und dem geringen Anteil an störenden Inhaltsstoffen in den juvenilen Stadien, ein geeignetes Objekt für eine cytologische Untersuchung dar.

Es wurden stets etwa 24 Std alte Bierwürze-Agar-Kulturen für das Studium der Kernteilungsvorgänge verwendet. Die Analyse der Mitose wurde an feuchten Deckglas-Ausstrichen, die sofort in die Fixierflüssigkeit übertragen wurden, vorgenommen.

Von Fixierflüssigkeiten wurden folgende angewendet: die Sublimat-Eisessiglösung nach FEULGEN, die Fixierungen nach CHAMPY, nach REGAUD, KARPET-SCHENKO, BOUIN, ZENKER und HELLY. Alle diese Fixierungen wurden im Hinblick auf ihre Wirkung auf Zelle und Zellkern wie auch auf ihre Anwendbarkeit für die Feulgen-Reaktion hin geprüft.

Das Sublimat-Eisessig-Gemisch nach FEULGEN führte zu Schrumpfungen der Zellen und Deformation der Vacuole. Die Kernsubstanz erfuhr eine sichel- oder uhrglasförmige Zusammenballung, die sich der Kernmembran einseitig anlagert. Ein ähnliches Fixierungsartefakt wurde

auch von ROCHLIN nach Fixierung mit Eisessigdämpfen, und später auch unter anderem von BADIAN (1939) und von LIETZ (1952) beschrieben. Diese Artefakte wurden irrtümlicherweise für den Ruhezustand des Kernes angesehen.

Bei der Fixierung nach CHAMPY macht sich die starke Schwärzung der Öltropfen störend bemerkbar. Die Zellen bleiben im allgemeinen gut erhalten, die Vacuolen jedoch sind meist nicht sichtbar. Im Kern kam, nach der Feulgen-Reaktion, ein grob zusammengeballtes Chromatin zum Vorschein. Die ab und zu in Erscheinung tretenden Körnchen stellen nicht die Chromosomen, sondern größere Chromatinaggregate dar. Mit FEULGEN zeigte die ganze Zelle in der Regel eine rötliche Färbung. Die Fixierung nach REGAUD ergibt bessere Resultate. Zwar sind die Zellen häufig geschrumpft, wohl auch durch die Hydrolyse stark angegriffen, doch der Kern erscheint gut erhalten.

Mit den Fixierflüssigkeiten von ZENKER und von HELLY wurden zur Vorbehandlung der Feulgen-Reaktion die besten Ergebnisse erzielt. Damit konnte weder eine nennenswerte Schrumpfung der Zellen, noch eine Verklumpung der chromatischen Substanz festgestellt werden. Die Auflösung der feineren Kernstruktur gelang wie mit keiner anderen Fixierungsmethode. Die nach HELLY fixierten und mit FEULGEN gefärbten Präparate dienten somit in erster Linie als Grundlage für die vorliegende Untersuchung des Hefezellkernes. Mit der Feulgenschen Nuclealreaktion werden die Desoxyribonucleinsäure führenden Kernstrukturen am klarsten dargestellt. Andererseits hat sie den Nachteil, daß mit ihr Kernmembran und Nucleolus nicht sichtbar gemacht werden können. Eine Gegenfärbung mit Lichtgrün oder mit Kristallviolett erwies sich als unbrauchbar, weil diese Farbstoffe den sehr kleinen Zellkern überdecken. Es mußte daher ergänzend nach Färbungen gesucht werden, die neben den Nucleinsäuren auch die Eiweißbestandteile im Kern sichtbar machen.

Nach der Flemmingschen Dreifachfärbung war der Kern nur als blaßroter, unstrukturierter Körper zu erkennen. Die Newtonsche Gentianaviolettffärbung ergab zwar eine tief blauviolette Färbung des Kernes wie auch die Ausdifferenzierung grobkörnig zusammengeballter Bestandteile, doch von der wirklichen Feinstruktur war auch hier nichts zu erkennen.

Die Giemsaefärbung nach der von LINDEGREN (1956) angewandten und von JACOBSON u. WEBB (1953) beschriebenen Methode brachte schließlich eine ideale Parallelfärbung zur Nuclealreaktion. Das Wesen dieser Methode besteht darin, daß die Zellen zwischen Fixierung und Färbung über Nacht mit 10% Perchlorsäure bei 4°C hydrolysiert werden. Dadurch werden alle sich sonst mit anfärbenden Inhaltsstoffe, hauptsächlich das Metachromatin, entfernt, und der Kern färbt sich tief rotviolett, während

das Plasma blaß blauviolett erscheint. Im Gegensatz zu LINDEGRENS Angaben wurde 1—2 Std lang gefärbt, mit feuchten Deckglasausstrichen gearbeitet, die Giemsa-Farblösung wurde mit WEISSES Puffersalzgemisch (HOLLBORN) angesetzt, und die gefärbten Präparate wurden nicht in Pufferlösung beobachtet, sondern über 3 Aceton-Xylolstufen schnell entwässert und schließlich in Immersionsöl (Zeiß) eingebettet.

Wie von JACOBSON u. WEBB (1952) angegeben wurde, färbte sich nicht nur die Thymonucleinsäure, sondern auch die mit ihr verbundene Eiweißkomponente. Dadurch hebt sich die Kernstruktur schärfer vom Cytoplasma ab und ist leichter zu beobachten. Nicht immer schien die Hydrolyse den Nucleolus völlig herauszulösen, er trat ab und zu blaßblau gefärbt in Erscheinung.

Zur Ergänzung des cytologischen Bildes wurde die Hämatoxylinfärbung nach HEIDENHAIN angewandt. Vergleichsweise wurde nach CHAMPY, KARPETSCHENKO und BOUIN fixiert. Das Cytoplasma zeigt bei der Hämatoxylinbehandlung eine starke Färbung; eine richtige Ausdifferenzierung des Kernes war schwierig, und es gelang nur durch Herstellung einer großen Anzahl von Präparaten, wenige richtig ausdifferenziert zu erhalten.

Bei der Fixierung nach CHAMPY zeigte sich, wie bereits bei der Feulgentchnik beschrieben, die Kernsubstanz stark verklumpt. Immer war ein tiefschwarz gefärbter Nucleolus vorhanden, welchem das hellere Chromatin halbmondförmig angelagert war.

Nach KARPETSCHENKO wurde kalt 1—2 Std fixiert. Der Kern zeigte wesentlich mehr Struktureinheiten, als es bei der Fixierung nach CHAMPY der Fall war.

Sehr gut eignete sich die Fixierung nach BOUIN für die Hämatoxylinfärbung. Die feuchten Deckglasausstriche kamen 12 Std in kalte Bouinsche Flüssigkeit. Die Differenzierung nahm hier längere Zeit in Anspruch als nach der Karpetschenko-Fixierung. Die Kernstrukturen waren aber feiner aufgelöst, das Chromatin erschien weder aufgequollen, noch geschrumpft. Nucleolus und Kernmembran waren neben den Chromatinbestandteilen gut wahrzunehmen.

Ergebnisse

Ruhekern und Mitosecyclus nach Helly-Fixierung und Nuclealreaktion

Der Gesamtcyclus der Mitose konnte am deutlichsten nach der Fixierung mit dem Hellyschen Gemisch verfolgt werden.

Es ergab sich zunächst, daß der Kern ein selbständiges, von der Vacuole unabhängiges Gebilde ist. Seine Lage neben der Vacuole wird nur durch die Raumverhältnisse bedingt. In älteren Zellen erfüllt die Vacuole nahezu den gesamten Zellraum und drängt den Kern zur Seite.

Abb. 6 zeigt in der Mutterzelle einen Ruhekern mit äußerst feiner Verteilung des Chromatins. Dies ist fast unsichtbar bis auf etwa 5 kleine, dichtere Körnchen. Das Chromatin des Ruhekernes ist so fein verteilt, daß es photographisch nicht wiederzugeben war. Die Kernmembran ist nach der Nuclealreaktion nur sehr schwer festzustellen. Es läßt sich jedoch ein heller Kernraum gegen ein dichter strukturiertes Cytoplasma stets beobachten. Im Übergang vom Ruhekern zur Prophase ist eine Verdichtung der Chromatinsubstanz zu erkennen. Die am Anfang sehr

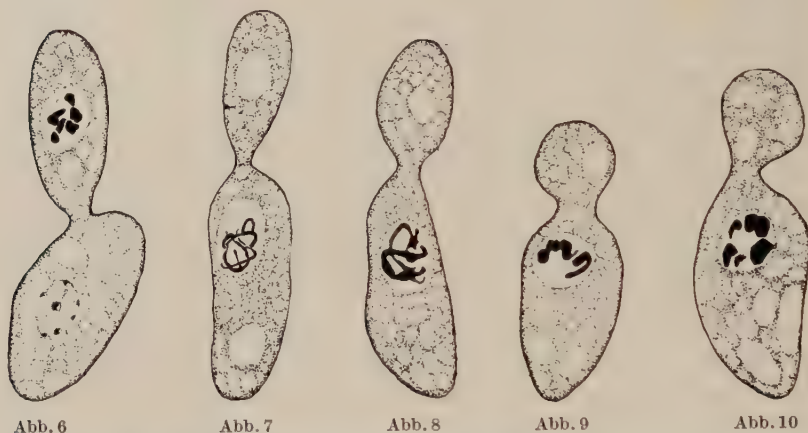


Abb. 6—18. Nach Präparaten mit Helly-Fixierung und Feulgenreaktion. Abb. 6—11 Ruhekern und Mitose bis zum Anaphasestadium. Abb. 12—14 Wanderung und Telophase. Abb. 15—18 Sonderfall der Mitose

feinen chromatischen Fäden verdicken und verkürzen sich. Sie füllen jetzt einen größeren Raum des Kernes aus, lassen aber an einem Pol noch eine Stelle frei. Man kann annehmen, daß sich an diesem Ort der noch nicht aufgelöste Nucleolus befindet (Abb. 7). In der späteren Prophase scheint der Nucleolus zu verschwinden, denn das Chromatin füllt nun den ganzen Kernraum aus (Abb. 8). Die Kernmembran bleibt erhalten, der Kernraum hat sich jedoch etwas vergrößert. Im Ruhestadium ist er 1—1,2 μ groß, und er erreicht während der Prophase einen Durchmesser von 1,5—2 μ . In Abb. 9 haben die Prophasechromosomen eine starke Verkürzung und Verdickung erreicht und beginnen, sich in den typischen Metaphasering anzuordnen.

In der Metaphase (Abb. 10) erreichen endlich die Chromosomen ihre stärkste Verkürzung und sind nur noch als kleine Häkchen oder Körnchen zu erkennen. Sie sind in der Metaphase immer ringförmig angeordnet, und es wurden in allen Fällen 6 Chromosomen gezählt.

Die einzelnen Chromosomen unterscheiden sich in Größe und Form voneinander. Neben 4 etwa gleichgroßen sind immer 2 kleinere Chromo-

somen zu beobachten. Diese können den größeren oft angelagert sein, wodurch der Anschein einer geringeren Zahl erweckt werden kann. Das Vorhandensein einer Metaphasespindel konnte nie, auch nicht bei den Hämatoxylinfärbungen, mit absoluter Sicherheit festgestellt werden.

In der frühen Anaphase (Abb. 11) weichen die beiden Chromosomensätze auseinander, und man kann bei seitlicher Lage 2 Chromatidenringe erkennen. Die gespaltenen Chromosomen liegen dicht nebeneinander, so



Abb. 11



Abb. 12



Abb. 13



Abb. 14

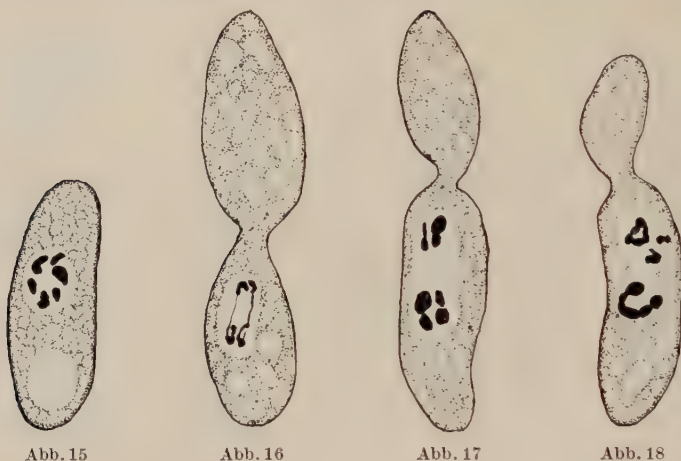
daß sie einzeln nicht wahrzunehmen sind. Je nach der Lage des Kernes kann diese Anaphasebewegung quer zur Längsachse der Mutterzelle oder in Richtung des Knospungspoles erfolgen.

Die Wanderung der Chromosomen in die Knospe ist, wie schon LIETZ betont, ein von der Mitose zu trennender Vorgang. In den meisten Fällen erfolgt sie im Anschluß an die Anaphase, noch ehe sich die Telophasekerne ausbilden konnten. Dabei ordnen sich die Chromosomensätze in perlschnurförmigen Reihen an, welche an der der Knospe zugewandten Spitze anfangs verschmolzen erscheinen, was wahrscheinlich nur der Ausdruck einer engen Zusammenlagerung ist, um die Wanderung durch den schmalen Knospungshals zu erleichtern. Dieses Stadium gibt Abb. 12 wieder. Sind die Chromosomen weit genug in die Tochterzelle vorgedrungen, spreizen sich die Ketten an den Enden auseinander.

Hat sich das Chromatin während der Fixierung zusammengeballt, so entsteht die oft beschriebene stundenglasförmige Figur. Dieses Stadium gibt Abb. 13 wieder. Beim Übergang des Wanderungsstadiums zur Telophase sind die Tochterchromosomensätze auseinandergewichen, wodurch wieder das Erscheinungsbild einer Anaphase auftritt. Die

Membran des Mutterkernes hat sich am Ende der Wanderung durchgeschnürt, und die beiden Tochterkerne haben sich vom Knospensansatzpunkt entfernt (Abb. 14).

LIETZ stellte bereits fest, daß neben der geschilderten Form der Mitose und der Chromatinverteilung noch eine zweite Möglichkeit existiert. In diesem Falle vollzieht sich die Kernteilung bis zur Ausbildung der Telophasekerne in der Mutterzelle, und der ausgebildete Tochterkern muß dann die Wanderung in die Knospenzelle vornehmen. Dieser Fall



tritt immer dann ein, wenn der teilungsbereite Kern bis zur Ausbildung der Anaphase nicht nahe genug an den Knospungspol gewandert ist, oder wenn dieses Stadium erreicht ist, ehe sich überhaupt eine Knospe entwickelt hat (Abb. 15, 16, 17, 18).

Kernteilung und Knospung scheinen nicht direkt miteinander verbunden zu sein. Es kann bis zur Metaphase und frühen Anaphase kommen, ehe überhaupt eine Knospe in Erscheinung tritt. Meist liegt der Kern dabei in der Mitte der Zelle oder an dem der Knospungszelle entgegengesetzten Pol und wandert nicht wie gewöhnlich während der Teilung auf den Knospungspol zu.

Nachschleppende Chromosomen, wie sie von LIETZ beschrieben wurden, konnten in der Anaphase ebenfalls beobachtet werden. Daß es sich bei dieser Erscheinung um eine Spindelbildung handelt, ist nicht anzunehmen, da die fragliche Struktur auch nach der Feulgenreaktion gefärbt erscheint (siehe Abb. 16).

In der Telophase treten die Chromosomen dann noch einmal als dichte Körnchen auf. Sie sind eng zusammengelagert und nicht getrennt voneinander wahrnehmbar, da die Größe der Tochterkerne nur mehr etwa $1\ \mu$ beträgt (siehe Abb. 14).

Zum Mechanismus der Mitose wäre darauf hinzuweisen, daß das Vorhandensein einer Spindel nicht absolut abzulehnen ist. Vor allem in den Anaphase- und späten Wanderungsfiguren konnte eine nach FEULGEN nicht gefärbte, stark lichtbrechende, mit Hämatoxylin grau-gefärbte Zwischensubstanz beobachtet werden. In der Telophase ist diese stark verlängert und viel schmäler geworden. Dies weist darauf hin, daß eine Anaphasespindel am Bewegungsmechanismus beteiligt sein kann. Für die Metaphase liegen sehr unsichere Beobachtungen vor, da dieses Stadium nur bei seitlicher Aufsicht auf den Metaphase-ring genau definiert werden kann.

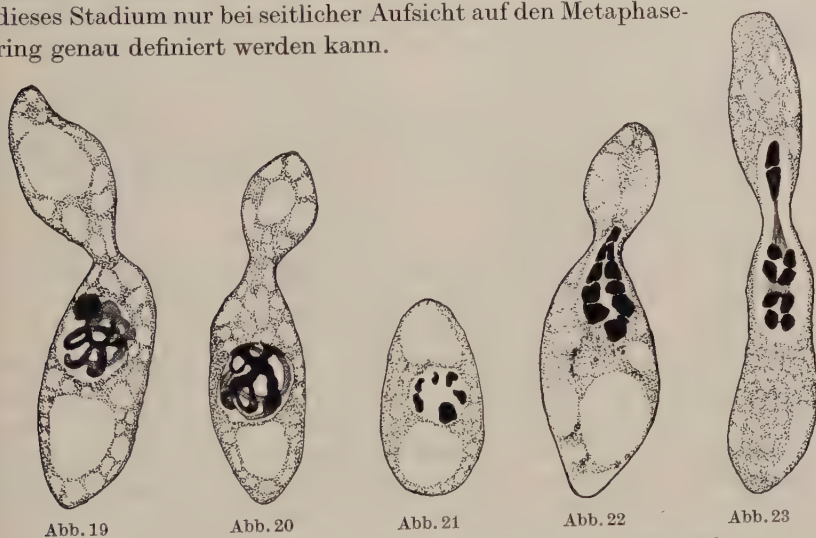


Abb. 19—23. Mitose und Kernwanderung nach Präparaten mit Giemsa-Färbung

Ergebnisse der Giemsa-färbung

Nach der von LINDEGREN angegebenen, etwas abgeänderten Methode der Giemsa-färbung erhält man denen der Nuclealreaktion entsprechende Strukturbilder der Hefezellkerne. Die gefärbten Kernbestandteile erscheinen kompakter und dichter, da sich, wie erwähnt, auch die Eiweißkomponente der Chromosomensubstanz mit anfärben läßt. Der Nucleolus scheint durch die Perchlorsäure-Hydrolyse nicht ganz entfernt worden zu sein. In den früheren Prophasen war er deutlich zu erkennen. Doch die störende Wirkung der ribonucleinsäurehaltigen Bestandteile im Cytoplasma war ausgeschaltet. Abb. 19 u. 20 sind eine frühe und eine späte Prophase. Bei Abb. 19 ist ein Nucleolus noch deutlich zu sehen. Die Metaphase Abb. 21 entspricht dem gleichen Stadium der Helly-Feulgen-Methode. Nur sind die 6 Chromosomen kompakter und auf der Mikrophotographie (siehe Abb. 32) nur 5 getrennte wahrnehmbar. Anaphase und Wanderung haben die gleiche Physiognomie wie nach der Nuclealreaktion. Abb. 22 u. 23 stellen 2 aufeinanderfolgende Wanderungs-

figuren dar. Bei Abb.23 ist bereits ein Zwischenraum zwischen dem Chromatin der Mutter- und Tochterzelle entstanden. Dadurch wird ein blaßblau gefärbter verbindender Strang sichtbar. Da das Chromatin nach dieser Methode immer dunkelrotviolett gefärbt ist, kann diese Zwischensubstanz nicht als Chromosomensubstanz angesprochen werden. Diese Erscheinung ist wieder ein Hinweis dafür, daß möglicherweise doch eine Art Spindelbildung am Wanderungsmechanismus beteiligt sein kann; vor allem, weil sie kein Einzelfall ist, sondern häufig beobachtet wurde. Auch die Hämatoxylinfärbungen zeigen entsprechende Bildungen.

Zeitlicher Ablauf der Mitosestadien

Aus der Häufigkeit des Auftretens der einzelnen, nach der Giemsa-methode darstellbaren Stadien, kann man auf ihre Ablaufgeschwindigkeit während der Mitose schließen.

Dabei stellt man einmal fest, daß ausgesprochene Ruhekerne sehr selten sind. Dies ist leicht erklärlich, wenn man bedenkt, daß die Zellausstriche von 24 Std alten, sich rasch vermehrenden Kulturen genommen wurden.

Sehr häufig sind Prophasen zu finden. Sie nehmen demnach den größten Zeitabschnitt in der Mitose ein. Gut ausgebildete Metaphaseringe sieht man dagegen seltener. Die Chromosomenteilung und das Auseinanderweichen der beiden Tochterchromosomensätze scheint daher rasch vonstatten zu gehen. Wanderungsbilder sind hingegen wieder öfter anzutreffen. Dies erklärt sich aus dem schwierigen Vorgang des Eindringens der Tochterchromosomen in die Knospe, wobei eine Streckung der Kernmembran und die Aufteilung und Einwanderung des Chromatins erfolgen muß.

Das Verhalten des Nucleolus

Interessant ist es noch, an Hand der Hämatoxylinpräparate das Verhalten des Nucleolus während der Mitose zu verfolgen. Der Nucleolus ist meistens rund, excentrisch in der Nähe der Kernmembran gelagert und kann, wie nach Bouinfixierung zu erkennen ist, nicht selten eine Vacuole besitzen. Allerdings hat es den Anschein, als ob der Nucleolus hier etwas gequollen wäre. Seine Größe ist nicht einheitlich, was wohl vom Entwicklungsstadium der entsprechenden Zelle abhängig ist. Zuweilen waren sogar 2 nebeneinander liegende Kernkörperchen wahrzunehmen. Schon in der späten Prophase trat der Nucleolus im allgemeinen nicht mehr in Erscheinung. Bei Fixierung nach KARPET-SCHENKO und Färbung mit Hämatoxylin nach HEIDENHAIN war bei den Wanderungsfiguren häufig in der Mutterzelle am Fuße der beiden Chromatinketten ein dunkel gefärbter Körper zu erkennen (siehe

Abb. 26). Daß es sich hierbei um einen Nucleolus handelt, ist nicht anzunehmen, weil nach Fixierung mit Bouinscher Flüssigkeit eine derartige Bildung nie beobachtet wurde. Wahrscheinlich handelt es sich um im Augenblick der Fixierung zusammengeballtes Chromatin. Die Mitosestadien, welche auf den nach KARPETSCHENKO und BOUIN fixierten und



Abb. 24—27. Ruhekern und Anaphase, Wanderungsstadium nach Hämatoxylinfärbung

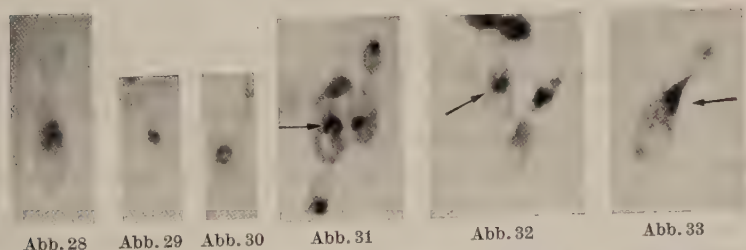


Abb. 28—30. Mikrophotographien nach Helly-Feulgen. Erklärung im Text. Vergr. 1000
Abb. 31—33. Mikrophotographien, Stadien nach Giemsa-Färbung. Vergr. 1000

nach HEIDENHAIN gefärbten Präparaten zu finden sind, entsprechen wieder den Stadien, wie sie nach der Feulgenmethode und der Giemsa-färbung zu beobachten waren. Abb. 24 ist eine Zelle mit Knospe, die sich kurz vor der Trennung befinden und Interphasekerne enthalten. Abb. 25 stellt eine Anaphase dar, Abb. 26 u. 27 sind Wanderungsstadien. Die Mikrophotographien eignen sich schlecht zur Reproduktion, deshalb seien nur einige abgebildet: Abb. 28—30 sind Mikrophotographien nach

HELLY-FEULGEN, eine späte Prophase (Abb. 28) und 2 Metaphasen (Abb. 29, 30). Abb. 31—33 sind Stadien nach der Giemsa-Färbung, Abb. 31 eine Zelle mit Ruhekern, Abb. 32 eine Metaphase, Abb. 33 eine Wanderungsfigur. Abb. 34—36 sind Stadien nach Hämatoxylinfärbung. Abb. 34 ein Interphasekern, Abb. 35 eine Prophase, Abb. 36 ein Wanderungsstadium, an welchem die noch nicht durchschnürte Kernblase zu erkennen ist.

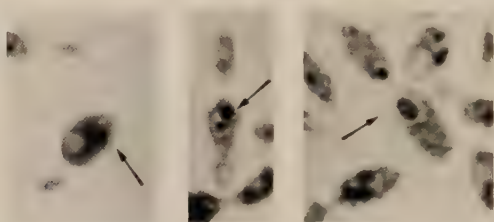


Abb. 34

Abb. 35

Abb. 36

Abb. 34—36. Mikrophotographien, Stadien nach Hämatoxylinfärbung. Vergr. 1000

Diskussion der Ergebnisse

Überblickt man die Ergebnisse vorliegender Untersuchung, so ergibt sich daraus, daß ein Zellkern bei den Hefen nunmehr mit voller Sicherheit nachgewiesen ist, der den Vorstellungen von einem normalen mitotischen Kern entspricht. Er steht nicht mit der Vacuole in Verbindung, wie es vor allem JANSSENS und LEBLANC (1898), WAGER und PENISTON (1910) sowie LINDEGREN (1949, 1953, 1954, 1956) behauptet haben, sondern ist ein autonomes Zellorganell, wie bei allen kernführenden Mikroorganismen. Die genannten Autoren bezogen den Kern immer in ein Kernvacuolensystem ein, wobei sie den eigentlichen Kern als Nucleolus, Centrosom oder kompakte Spindel, auf der die Mitose stattfindet, ansahen. Die Lagebeziehung, in welcher Kern und Vacuole häufig zu finden sind, ist lediglich durch die Raumverhältnisse in den Hefezellen bedingt. Die verhältnismäßig große Vacuole füllt den Hauptteil der Zelle aus. Der Kern liegt meistens polar, lateral verschoben neben der Vacuole oder bei 2 Vacuolen in der Plasmabrücke zwischen diesen. Er besteht aus einer Kernmembran, einem ungefärbten Karyoplasma, dem Nucleolus und etwa 5 Chromatinkörnchen, die nach der Nuclealreaktion schwach, nach GIEMSA etwas stärker gefärbt erscheinen.

GUILLIERMOND (1917) und RENAUD (1938) beschreiben den Ruhekern in ähnlicher Weise. GUILLIERMOND schildert den teilungsbereiten Zygotenkern von *Schizosaccharomyces octosporus* (1917) folgendermaßen: „Seine Struktur ist sehr sauber und distinkt: ein ungefärbtes Nucleoplasma, begrenzt durch eine gefärbte Membran, innerhalb der Membran hebt sich ein großer Nucleolus ab und 2—3 Chromatinkörnchen.“

Der Nucleolus wurde häufig nicht festgestellt. BADIAN (1937) lehnt seine Existenz ab, es sei denn, er wäre mit der Stelle identisch, die sich nach GIEMSA nicht färbt. Auch LIETZ (1951) konnte im Ruhekern keinen Nucleolus finden, da er die Hämatoxylinfärbung nicht voll auswertete und die Kernstrukturen nur nach Feulgenpräparaten untersuchte. Nach seiner Annahme erfüllt das Metachromatin die Aufgabe eines extranucleären Nucleolus. Da aber ein echter Nucleolus nachgewiesen wurde, ist diese Annahme nicht mehr zwingend.

Der von GUILLIERMOND (1903) und RENAUD (1938) dargestellte Mitoseablauf konnte nicht akzeptiert werden. Sie bringen Mitose- und Wanderungsfiguren durcheinander, Pro- und Metaphasen bilden sie gar nicht ab. Dagegen sind unter den Darstellungen von FUHRMANN (1906) und NAGEL (1946) Stadien enthalten, die man als späte Prophasen bezeichnen könnte. LEVAN (1947) und LIETZ (1951) stellen die Metaphasen, wie es auch in den vorliegenden Untersuchungen gefunden wurde, als Chromosomenringe dar, LIETZ kam bei Chromosomenzählungen bei *Saccharomyces priorianus* ebenfalls auf die Zahl 6. Neben 4 größeren waren immer 2 kleinere zu erkennen, die den größeren ab und zu eng anliegen konnten. Prophasen mit ausdifferenzierten Chromosomenschleifen bildet er aber nicht ab. Auch vom Ruhekern wurde durch die vorliegende Arbeit eine andere Vorstellung gewonnen, als LIETZ sie gab.

GUILLIERMOND (1903, 1917), RENAUD (1938), LIETZ (1951) und die Mehrzahl der anderen Autoren gelangen zu der Auffassung, daß bei den Hefen eine intranucleäre Mitose stattfindet. Dies konnte bestätigt werden. Die Kernmembran kommt nie zur Auflösung. Sie dehnt sich in die Länge, buchtet sich in die Knospe vor und erfährt am Ende der Telophase eine Durchschnürung. Das ist besonders auf den Photographien dieser Stadien nach der Bouinfixierung und Hämatoxylinfärbung zu erkennen (Abb. 36), da sich hier das dunkel gefärbte Plasma von dem ungefärbten Karyoplasma, welches von der Kernmembran begrenzt wird, gut abhebt. Diese Persistenz der Kernmembran, das Nachschleppen einzelner Chromosomen in der Anaphase und die Trennung von Mitose- und Wanderungsstadien der Chromosomen wurde eindeutig festgestellt. Dies steht mit den Untersuchungsergebnissen von LIETZ in Übereinstimmung.

Eine Zahl von 6 Chromosomen wäre nach den genetischen Untersuchungen von LINDEGREN (1949) und WINGE (1951) durchaus vertretbar. Beide Autoren gelangten zu dem übereinstimmenden Ergebnis, daß eine von BADIAN (1937), DURAISWAMI (1953), ROYAN (1953) und anderen angegebene Zahl von 2 Chromosomen genetisch nicht vertretbar sei. Da die untersuchte Wildhefe sich vollkommen asexuell verhielt, kann es sich vielleicht um eine diploide Form handeln. Eine Sporenbildung konnte jedenfalls nie beobachtet werden. Sie unterlag während der

1 $\frac{1}{2}$ jährigen Kultivierung keinerlei Veränderungen in bezug auf die Kolonieform, Zellform und Größe, was zur Unterstützung dieser Annahme führt. Aus LINDEGRENS und WINGES genetischen Untersuchungen geht hervor, daß sporenbildende und sexuell reagierende Hefen sehr variabel sind und eine ursprüngliche Form nur durch häufiges Abimpfen diploider Kulturen erhalten werden kann, da so die Sporenbildung verhindert wird.

Schlußbemerkungen

Infolge der ungünstigen Lichtbrechungsverhältnisse, die durch die Form der Hefezelle bedingt sind, konnten bisher, trotz des von MÜLLER (1956) ausgearbeiteten Gelatinegelverfahrens durch Phako-Lebendbeobachtung noch keine Einzelheiten der Teilungsvorgänge am Zellkern beobachtet werden. Man ist also auf fixiertes und gefärbtes Material angewiesen und muß die Aufeinanderfolge der Vorgänge aus Präparaten zusammenstellen. Diese Methode birgt Fehlerquellen in sich, zumal es sich hier während der Teilung um 1—2 μ große Kerne handelt, und die Kleinheit der Strukturen die Beobachtung sehr erschwert. Als Vorbild für den zusammengestellten Mitosecyclus dienten die klassischen Mitosestudien von BELAR, DARLINGTON, GEITLER und MILOVIDOV, die entweder an großkernigen höheren Pflanzen oder an niederen Pflanzen mit größeren Kernen gemacht wurden.

Daß die einzelnen Stadien, schon durch die Kleinheit des Kernes bedingt, diesen klassischen Vorbildern nicht gleichen können, ist verständlich. Allein diese Tatsachen haben einen besonderen Kern- und Teilungstypus zur Folge. Dazu kommen die hohe Zellteilungsrate auf günstigem Medium und der besondere Verteilungsmechanismus des Chromatins, verursacht durch die Sprossung als vegetative Vermehrungsform, wobei die chromatischen Strukturen durch den engen Knospungshals wandern.

Aus den vorliegenden Ausführungen geht einwandfrei hervor, daß es sich bei den Kernteilungen nicht um Amitosen, sondern um mitotische Vorgänge im wirklichen Sinne des Wortes handelt. Für eine einfache Kerndurchschnürung sind solche Vorgänge wie die Ausdifferenzierung einzelner Chromatinelemente nicht notwendig. Die gefundenen Stadien wurden folglich im Sinne einer echten Mitose interpretiert. Die Prophasen und die Metaphaseringe entsprechen durchaus den klassischen Mitosebildern.

Zusammenfassung

1. Der Zellkern der Hefen wurde durch die Nuclealreaktion, die Giemsa-Färbung und die Hämatoxylinfärbung nach HEIDENHAIN untersucht.

2. Er erwies sich als ein von der Vacuole selbständiger Körper.

3. Seine Bestandteile sind: eine Kernmembran, ungefärbtes Karyoplasma, ein mit Hämatoxylin gut färbbarer Nucleolus und im Ruhezustand etwa 5 feine Chromatinkörnchen.

4. Die vegetative Teilung findet als Mitose statt, mit Prophase, Auflösung des Nucleolus und im weiteren Verlaufe Meta-, Ana- und Telophase.

5. Die Wanderung des Chromatins in die Knospe ist ein von der Mitose unabhängiger Vorgang. Sie erfolgt stets in charakteristischer Weise der Chromosomenkettenbildung aus den beiden Chromosomensätzen, die sich in die Knospe vorschieben, worauf sich der in der Knospe befindliche Teil von dem in der Mutterzelle befindlichen trennt und die beiden Tochterchromosomensätze die halbringförmigen Telophasefiguren, in denen die Einzelchromosomen noch zu erkennen sind, bilden.

6. Die Aufteilung der Chromosomen kann nicht zufällig sein, da sonst eine Variabilität der Art zu beobachten wäre, sie findet ganz gesetzmäßig geordnet statt.

7. Mitose und Wanderung vollziehen sich innerhalb der Kernmembran, die sich erst nach der Telophase durchschnürt.

8. Eine Metaphasespindel konnte infolge der Kleinheit der Kerne nicht eindeutig nachgewiesen werden, doch ist das Vorhandensein einer solchen nicht völlig von der Hand zu weisen. Ana- und Telophase, vor allem bei Hämatoxylinfärbung, zeigen spindelähnliche Bildungen.

Herrn Prof. Dr. B. SCHUSSNIG möchte ich an dieser Stelle für die Anregung zu dieser Arbeit, sein ständiges Interesse und seine beratende Hilfe, sowie für die Benutzung seiner Bibliothek und privater optischer Geräte herzlich danken. Frau N. J. W. KREGER-VAN RIJ danke ich herzlich für die Bestimmung der Art und die Aufnahme des Stammes in die Sammlung des Zentralbüros für Schimmelpkulturen (Baarn), Hefeabteilung (Delft).

Literatur

BADIAN, J.: Bull. Int. Acad. Polonaise, Ser. B, Sci. Nat., **1**, 61 (1937). — BEAMS, H. W., L. W. ZELL u. N. H. SULKIN: Cytologia, Tokyo, **11**, 30 (1941).

DARLINGTON, C. D.: Recent advances in cytology, London (1937). — DELAPORTE, B., u. N. ROUKHELMAN: C. r. Acad. Sci. Paris, **206**, 1399 (1938). — DELAPORTE, B.: Rev. Gen. Bot., **51**, 449 (1939). — DURAISWAMI, S.: Cellule, **55**, 381 (1953).

FUHRMANN, F.: Zbl. Bakter. II, **15**, 769 (1906).

GEITLER, L.: Grundriß der Cytologie, Berlin (1938). — GUILLIERMOND, A.: (1) Rev. Gen. Bot. **15**, 49 (1903). — (2) Ann. Inst. Pasteur, **31**, 107 (1917). — (3) Rev. Gen. Bot., **48**, 414 (1936).

IMSHENECKI, A.: Zbl. Bakter. II, **94**, 330 (1936).

JACOBSON, W., u. M. WEBB: Exp. Cell Res., **3**, 163 (1952). — JANSSENS, F. A., u. A. LEBLANC: Cellule, **14**, 201 (1898). — JANSSENS, F. A.: Cellule **20**, 335 (1903).

KATER, J.: Biol. Bull. Marine Lab. Woods Hole, Mass., **52**, 436 (1929).

LIETZ, K.: Arch. Mikrobiol. **16**, 275 (1951). — LEVAN, A.: Hereditas **33**, 457 (1957). — LINDEGREN, C. C.: „The Yeast Cell, its genetic and cytology“ (1) Ed. publ. Incomp. Saint Louis (1949). — LINDEGREN, C. C., u. M. M. RAFALKO: Exp. Cell Research **1**, 169 (1950). — LINDEGREN, C. C., u. G. F. TOWNSEND: Cytologia, Tokyo, **19**, 104 (1954). — LINDEGREN, C. C., M. A. WILLIAMS u. D. O. McCLARY: Antonie van Leeuwenhoek, Journ. of Microbiol. and Serology, Vol. **22**, 1 (1956). — LODDER, J., u. N. J. W. KREGER-VAN RIJ: The Yeasts, a taxonomic study, Amsterdam (1952).

MEISSEL, M. N.: Bull. Biol. et Med. exper., USSR, **6**, 294 (1938). — MÜLLER, R.: Naturwissenschaften **18**, 428 (1956). — MILOVIDOV, P. F.: Physik und Chemie des Zellkernes. Berlin: Borntraeger 1949.

NÄGEL, L.: Ann. Miss. Bot. Garden **33**, 249 (1946).

RENAUD, J.: C. r. Acad. Sci. Paris **206**, 1918 (1938). — ROCHLIN, E.: Zbl. Bakter. II, **88**, 304 (1933). — ROYAN, S.: Arch. Mikrobiol. **19**, 381 (1953).

SCHUSSNIG, B.: Handbuch der Protophytenkunde. Jena: Fischer 1953. — SWELLENGREBEL, M.: Ann. Inst. Pasteur **19**, 503 (1905).

TOWNSEND, G. F., u. C. C. LINDEGREN: Cytologia, Tokyo **18**, 183 (1953). — THYAGARAJAN, T. R., u. M. H. SUBRAMANIAM: Naturwissenschaften **44**, 68 (1957).

VOIGT, K.: Zeitschr. für exper. Med. **55**, 569 (1927).

WAGER, H., u. A. PENISTON: Ann. Bot. **24**, 45 (1910). — WIDRA, A., u. D. DE LAMATER: Amer. Journ. of Botany, **42**, 423 (1955). — WINGE, O.: C. r. Labor. Carlsberg. Ser. physiol. **25**, 85 (1951).

(Aus der Botanischen Abteilung Madaus, Köln-Merheim)

Untersuchungen zur Biologie der Erbsenmycorrhiza*

Von

ROSWITHA SCHRADER

Mit 21 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Februar 1958)

Die Stärke der Verpilzung einer Wurzel mit endotropher oder ektotropher Mycorrhiza ist keine konstante Größe. MELIN (1927), BJÖRKMAN (1942) und BURGESS (1939) beobachteten Schwankungen des Verpilzungsgrades bei Wurzeln in Böden aus verschiedener Tiefe. Jahreszeitlich gebundene Infektivitätsänderungen erwähnen HATCH (1937) und SIEVERS (1953).

Seitdem die Sterilkultur ektotropher Pilze möglich ist, konnte einiges zur Klärung des Problems des schwankenden Verpilzungsgrades beigetragen werden (MELIN 1925, BJÖRKMAN 1942). Dieser Weg ist uns einstweilen leider für die endotrophe Mycorrhiza versperrt, weil die Reinkultur dieser Pilze bis jetzt in keinem Falle gelungen ist. Der für die Stärke des Mycorrhizabefalls verantwortliche Hauptfaktor dürfte die Zahl der infektionsfähigen Stadien des Pilzes im Boden sein, die aber bislang unbekannt sind.

MOLLBERG (1884) beobachtete zum ersten Mal in dem Rindenparenchym der Wurzeln von *Platanthera bifolia* und *Epipactis latifolia* knopfförmige oder lange keulige Auftreibungen interkalar oder terminal an den Hyphen, seither werden diese Vesikel des öfteren als Infektionsstadien angesprochen. Aber es stehen sich noch immer zwei Ansichten über die Bedeutung dieser plasmareichen Pilzstadien gegenüber. JANSE (1897), der Vesikelbildung bei vielen Pflanzen beobachtet hat, vergleicht sie als erster mit den Cysten, die bei anderen Pilzen zu finden sind und für die ungeschlechtliche Vermehrung des Endophyten eine Rolle spielen. Diese Ansicht wird von den meisten Forschern vertreten, die wie WINTER (1951) die Vesikel als „Dauerfruchtformen“ ansprechen. Andere deuten die Vesikel als Reservestoffbehälter (als erster GALLAUD, 1905, in seiner Untersuchung endotropher Mycorrhizatypen).

In dieser Arbeit wird versucht, das für die Infektion der Erbsenwurzeln mit dem Mycorrhizapilz verantwortliche Pilzstadium zu ermitteln, den Entwicklungsgang der Pilzinfektion klarzustellen und durch Variation der Versuchsbedingungen Einfluß auf diesen Entwicklungsgang zu gewinnen.

* Dissertation der mathem.-naturwissenschaftl. Fakultät der Universität Bonn.

I. Methodik

A. Material und Anzucht

Als Versuchsobjekt diente *Pisum sativum* L., „Wunder von Kelvedone“, eine Straucherbse, die etwa 40 cm hoch wird. Alle Versuche wurden im Gewächshaus durchgeführt. Vom 15. Oktober bis 15. März wurden die Versuchspflanzen zusätzlich 16 Std mit Osram-Siccathermlampen IS beleuchtet, die in 80 cm Abstand voneinander und von den Töpfen aufgehängt waren.

Die ungequollenen Samen wurden 6—7 Tage in Sand vorgekeimt und dann erst in das eigentliche Versuchssubstrat gepflanzt.

Der mycorrhizasterile Sand, in dem die Erbsen vorgekeimt wurden, der auch zur Zubereitung der Modellböden und zum Beschatten der Versuchserde verwendet wurde, stammt von der Firma Winter in Horrem bei Köln und wird oberhalb der Braunkohle aus etwa 25 m Tiefe gewonnen.

Die für die meisten Versuche verwendete Erde lagerte auf einem dauernd bepflanzten Gartenbeet. Sie setzt sich aus sandigem Lehm, Kies (der unter der Rollbahn eines Flughafens gelegen hat) und Kompost zusammen. Diese Gartenerde wurde bis zu einer Tiefe von etwa 20 cm, d. h. nur aus dem Wurzelbereich, 2 bis 3 Tage vor Versuchsbeginn entnommen.

Zum Versuch wurde der Boden durch ein Sieb von 0,5 cm Maschenweite gegeben, um groben Kies und Reste von Pflanzenwurzeln zu entfernen.

B. Durchführung der Versuche

In das vorbereitete Substrat wurden die vorgekeimten Erbsen in Töpfen von 8 cm Durchmesser gepflanzt. Als Versuchsbeginn ist immer das Datum des Einpflanzens ins eigentliche Versuchssubstrat angegeben.

Die Untersuchung der Erbsenpflanzen auf Mycorrhizabefall erfolgte — außer in den Infektionsversuchen — in 3 Entwicklungsstadien: 1. mit 3,5 Blättern¹, wenn erfahrungsgemäß die Pilzinfektion beginnt; 2. zu Blühbeginn; 3. mit reifer Frucht. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden je 10 ganze Wurzelsysteme fixiert, gefärbt und vollständig zu Längsschnitten verarbeitet.

Zum Fixieren wurden die ganzen, vorsichtig unter Wasser aus dem Substrat ausgewaschenen Wurzelsysteme einzeln für 10—20 Std in 1%ige Chromsäure nach JOHANSEN (1940) eingelegt. Sie wurden dann unter fließendem Wasser gut ausgewaschen und in Heidenhains Hämatoxylin (ROMEIS 1948) gefärbt. Als dann können Haupt- und Nebenwurzeln getrennt zu Längsschnitten verarbeitet und in Glyceringelatine nach Kaiser eingebettet werden.

C. Auswertung der Versuche

Zur Versuchsauswertung wurde die Zahl der verpilzten Schnitte der einzelnen Pflanzen — für Haupt- und Nebenwurzeln getrennt — festgestellt und in Prozenten der gesamten Schnittzahl als „Verpilzungsgrad“ errechnet. Der als Versuchsergebnis jeweils angegebene „Verpilzungsgrad D“ ist der Durchschnittswert der 10 Parallelpflanzen. Die als Sproß- und Fruchtlänge, Frisch- und Trockengewicht jeweils angegebenen Werte D sind ebenfalls Durchschnittswerte von je 10 Einzelpflanzen. Nur als „Verpilzungsgrad“ angegebene Ergebnisse werden an Ort und Stelle erklärt.

Als Vesikelzahl ist die Zahl der Präparate mit Vesikeln in Prozenten der gesamten Präparatezahl einer Versuchsgruppe angegeben.

¹ 0,5 Blatt = Fiederblatt mit noch zusammengeklappten Einzelblättchen.

II. Verpilzungsgrad und Vesikelzahl in verschiedenen Böden

A. Böden aus dem Freiland

1. Boden aus verschiedener Tiefe

In einem Vorversuch sollte geprüft werden, bis zu welcher Tiefe ein Boden noch infektiös wirkt.

Als Substrat wurde Humuserde vom Kreuzberg (Bonn) aus dem Bereich einer Buche über einer Lößwand benutzt. Die erste Schicht wurde unmittelbar von oben weggenommen (0—20 cm tief), die zweite gerade über dem Löß (20—40 cm tief), noch aus dem Wurzelbereich. Unterhalb des Wurzelbereichs wurden alle 40 cm weitere Proben genommen, bis zu 1,60 m Tiefe.

Die Zahl der Pflanzen für jede Versuchsgruppe wurde hier auf 2 beschränkt.

Tabelle 1. *Böden aus verschiedener Tiefe*

Versuchsbeginn 9. 5. 55	Schicht I 0—20 cm tief				Schicht II 20—40 cm tief			
	Verpilzung %	Vesikel %	Außen-vesikel	Außen-Hyphen	Verpilzung %	Vesikel %	Außen-vesikel	Außen-Hyphen
1. Unters., 19. 5. 55 3,5 Blatt	5,2	0,00	—	+	0,00	0,00	—	+
2. Unters., 23. 5. 55 Knospe	17,3	16,66	—	+	5,1	0,00	—	+
3. Unters., 31. 5. 55 Blüte	32,4	60,00	—	+	21,1	50,00	—	+
4. Unters., 7. 6. 55 Frucht	36,4	100,00	+	+	23,6	83,33	+	+

Nur in den beiden oberen Schichten, die aus dem Wurzelbereich entnommen wurden, tritt Verpilzung und Vesikelbildung auf (Tab. 1), in Schicht I höherer Verpilzungsgrad und größere Vesikelzahl als in Schicht II. Die Unterschiede sind vor allen Dingen in den frühen Entwicklungsstadien auffallend.

In den Lößschichten unterhalb des Wurzelbereichs konnte keine Verpilzung festgestellt werden. Außerdem ist in ihnen das Wachstum von Sproß und Wurzel gehemmt. Das Wachstum der Pflanzen ist am besten in Schicht I und wird um so schlechter, aus je größerer Tiefe der Kulturboden entnommen wurde.

Das bessere Wachstum ist begleitet von einer früheren und stärkeren Infektion mit dem Mycorrhizapilz und ebenfalls mit *Bacterium radicola*.

2. Frische Gartenerde im Verlauf eines Jahres

Da sich also nur Erde aus dem Wurzelbereich als infektiös erwies, wurde die Gartenerde zu den Versuchen immer nur aus 0—20 cm Tiefe genommen.

Um die Veränderung des Verpilzungsgrades im Verlauf eines Jahres festzustellen, wurde *Pisum sativum* alle 14 Tage in frische Gartenerde vom gleichen Standort vom 2. Dezember 1955 bis zum 15. November 1956 ausgepflanzt. Im Februar 1956 mußte der Versuch ausfallen, weil der Boden zu hart gefroren war. Diese Jahresversuche dienen gleichzeitig als Kontrolle zu den jeweils angesetzten anderen Versuchen. Sie werden als „Kontrolle aus dem Jahresversuch“ bezeichnet.

Es wurde versucht, bei dieser Langtagpflanze den Blühtermin auch im Winter nach Möglichkeit konstant zu halten, durch 16 Std Zusatzbeleuchtung (vom 15. Oktober bis 15. März) mit Osram Siccathermlampen IS.

Aus Vorversuchen hatte sich ergeben, daß im 3,5 Blatt-Stadium in der Regel eine Anfangsverpilzung zu erwarten ist. So konnte in allen Jahresversuchen bei der ersten Untersuchung eine — manchmal nur an einigen Eintrittsstellen zu erkennende — Verpilzung festgestellt werden.

Versuche mit reichlicher Anfangsverpilzung zeigen in der Regel auch hohe Endverpilzung. Die größte Zunahme der Verpilzung findet meistens erst nach der Blütezeit statt. Nur bei Versuch A IV, V, VIII, XIV, XVII und XVIII nimmt die Verpilzung hauptsächlich bis zum Blühtermin zu. Bei A IV steigt der Mycorrhizabefall nach der Blüte gar nicht mehr an (Erklärung siehe unten).

Es ist wahrscheinlich — falls überhaupt ein Stoffaustausch zwischen Pilz und Wirt stattfindet —, daß die Pflanzen nach der Blütezeit, d. h. nach Abschluß der vegetativen Entwicklung, für die Ausbreitung der Mycorrhiza mehr Material zur Verfügung stellen können. So darf es nicht verwundern, daß — von gewissen Sonderfällen abgesehen — die größte Zunahme der Mycorrhiza im Wurzelparenchym und Ausbildung von Vesikeln (wie später gezeigt wird) nach dem Blühtermin der Wirtspflanze stattfindet.

Von den auf die Entwicklung der Mycorrhiza im Laufe eines Jahres Einfluß nehmenden Außeneinflüssen konnte nur der der Sonneneinstrahlung geprüft werden. Abb. 1 zeigt die Strahlungskurve (in $\text{cal cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ als Durchschnittswerte der Tagessumme von 5 Tagen) über den Kurven des Jahresversuches.

Ein bedeutender Anstieg oder Abfall der Lichtintensität, sowie eine über längere Zeit gleichbleibende Sonneneinstrahlung sind im allgemeinen nur dann für den weiteren Verlauf der Verpilzungskurve entscheidend, wenn sie bis zum Blühtermin — d. h. während der Zeit des intensivsten Baustoffwechsels — erfolgen.

Ein großer Anstieg der Lichtintensität 10—5 Tage vor dem Blühtermin äußert sich in einem entsprechenden Anstieg der Verpilzungskurven (A III und A IX). Sehr starker Abfall der Sonneneinstrahlung kurz vor der Blüte, ohne einen Wiederanstieg über 30 cal nach der Blüte, unterbindet, wie Versuch A IV zeigt, ein weiteres Zunehmen der Verpilzung nach der Blütezeit. Bei gleichbleibender mittlerer Lichtintensität zeigen die Versuchskurven A V, VI, X, XII und XVI einen entsprechenden nur mäßigen Anstieg.

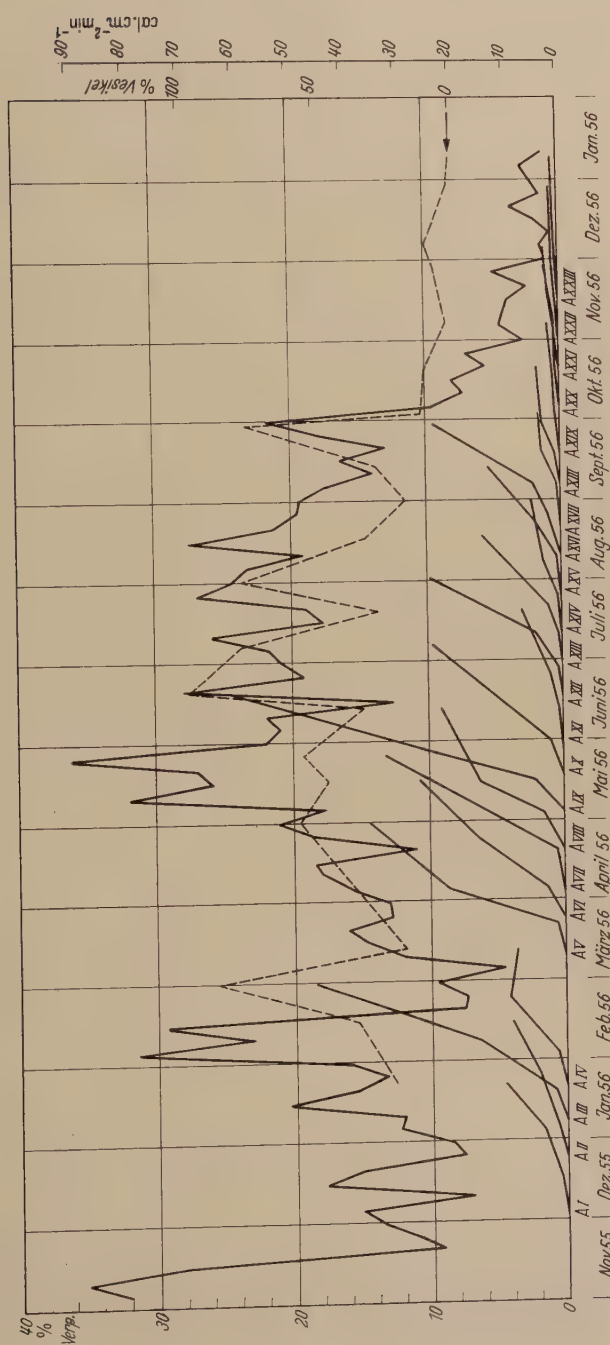


Abb. 1. Frische Gartenerde im Verlauf eines Jahres. — Jahresversuche A I bis A XXIII Verpilzungsgrad; — — — Jahresversuche A I bis A XXIII höchste Vesikelszahl; — — — Sonnenstrahlung in $\text{cal cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ Durchschnittswerte der Tagessumme von 5 Tagen. (Die Werte für die Sonneneinstrahlung stammen von der Wetterwerte in Köln-Lindenthal, Strahlungsschreiber: Robitsch-Fuess B 3507)

Eine Sonneneinstrahlung von ≤ 35 cal je Quadratcentimeter in der Minute vor der Blütezeit, war zu gering, um eine gute Verpilzung der Erbsenwurzeln zu erreichen (Versuche vom Oktober 1956 bis Januar 1957). So ist es verständlich, daß die Siccathermlampen, die nur zur Verlängerung des Tages dienten, keinerlei Einfluß auf den Verpilzungsgrad ausübten. Die geringen Lichtstärken, die für die Entwicklungsbeschleunigung von Langtagpflanzen ausreichen, sind zu gering, um eine Steigerung der Verpilzung zu bewirken.

Das trübe Wetter im Sommer 1956 findet seinen Niederschlag in der geringen Verpilzung der Erbsenwurzeln. Die hohen Lichtwerte im Februar (A III) und im Mai (A IX) bringen die stärksten Verpilzungen des ganzen Jahres. Dabei ist zu beachten, daß bei A III eine Verpilzung von 18% in 54 Tagen, bei A IX schon in 37 Tagen erreicht wird (vgl. Abb. 1).

Parallel mit dem Zunehmen der prozentualen Verpilzung geht ein Ansteigen der Vesikelzahl. Bei den meisten Versuchen konnten im Stadium von 3,5 Blättern (A I, II, III, IV, VII, XI, XIII, XIV, XV, XVII, XIX—XXIII) noch keine Vesikel gefunden werden. Zur Zeit der Blüte waren nur A I, XIX, XXII und XXIII ohne Vesikel (vgl. Abb. 1). Nach der Blüte, mit dem Einsetzen des stärkeren Pilzwachstums, setzte dann die Vesikelvermehrung ein. Die höchste Vesikelzahl innerhalb der Pflanze wurde zur Zeit der reifen Frucht beobachtet. Sie ist dort am höchsten, wo die stärkste Verpilzung zu Versuchsende ist und wahrscheinlich auch abhängig von der Lichtintensität (vgl. Abb. 1). Die beiden Kurven mit der höchsten Verpilzung (A III 18,50%, A IX 24,40%) erreichen auch die größten Vesikelzahlen (A III 86,51%, A IX 97,05%). In den nur wenig verpilzten Versuchspflanzen vom Oktober bis Dezember 1956 konnten kaum Vesikel festgestellt werden.

Also zeigen sowohl die Verpilzung des Wurzelrindenparenchyms als auch die Zahl der in seinen Interzellularen gebildeten Vesikel eine Abhängigkeit von der Sonneneinstrahlung. Damit soll aber nicht behauptet werden, daß nicht auch andere Außeneinflüsse von Bedeutung sein konnten können.

3. Gelagerte Gartenerde zu verschiedenen Jahreszeiten bepflanzt

Um den Einfluß des Komplexes von Außeneinflüssen, von dem wir die Sonneneinstrahlung haben fassen können, noch einmal deutlich zu machen, wurde ein und dieselbe Gartenerde 1. sofort bepflanzt (Versuch A XV); 2. für sechs Wochen in Blumentöpfen im Gewächshaus gelagert, in dieser Zeit mäßig gegossen und dann bepflanzt [Versuch A (XV) gleichzeitig mit dem Jahresversuch A XIX]; 3. für zwölf Wochen wie 2. behandelt und dann bepflanzt [Versuch A (XV)² gleichzeitig mit dem

Jahresversuch A XXIII]. Es sollte also versucht werden, die Zahl der Infektionsstadien im Boden über eine gewisse Zeit zu konservieren, indem die Versuchserde den Außeneinflüssen im Freiland entzogen wurde.

Tabelle 2. *Gelagerte Gartenerde zu verschiedenen Jahreszeiten bepflanzt*
Versuche: A XV A (XV) A (XV)². Kontrollen aus dem Jahresversuch: A XIX A XXIII

Versuch	Unters., Zeitpunkt Stadium	Verpilzungsgrad <i>D</i> in Prozent	Eintrittsstellen Hyphen Verdauungsstadien	Vesikelzahl <i>D</i> in Prozent	Außen-vesikelzahl <i>D</i> in Prozent	Sproß Länge <i>D</i> in cm
A XV 26. 7. 56	1. Unters., 8. 8. 56 3,5 Bl.	0,21	Hyphen wenig Verdauungsstadien	0,00	0,00	8,56
A XV	2. Unters., 22. 8. 56 Blüte	1,97	Hyphen Verdauungsstadien	12,17	0,86	14,32
A XV	3. Unters., 12. 9. 56 reife Fr.	5,37	Hyphen Verdauungsstadien	28,38	0,64	17,57
A (XV) 19. 9. 56	1. Unters., 4. 10. 56 3,5 Blatt	0,21	Eintrittsstellen	0,00	0,00	9,58
A (XV)	2. Unters., 17. 10. 56 Blüte	0,36	Hyphen Verdauungsstadien	0,00	0,00	19,96
A (XV)	3. Unters., 6. 11. 56 reife Fr.	0,79	Hyphen Verdauungsstadien	3,92	0,00	21,82
A XIX 19. 9. 56	1. Unters., 4. 10. 56 3,5 Blatt	0,26	Eintrittsstellen	0,00	0,00	9,78
A XIX	2. Unters., 17. 10. 56 Blüte	0,37	Hyphen Verdauungsstadien	0,00	0,00	18,21
A XIX	3. Unters., 6. 11. 56 reife Fr.	0,68	Hyphen Verdauungsstadien	2,17	0,00	20,77
A (XV) ² 15. 11. 56	1. Unters., 27. 11. 56 3,5 Blatt	0,21	Eintrittsstellen	0,00	0,00	9,96
A (XV) ²	2. Unters., 17. 12. 56 Blüte	0,21	Hyphen wenig Verdauungsstadien	1,09	0,00	18,38
A (XV) ²	3. Unters., 3. 1. 57 reife Fr.	0,54	Hyphen Verdauungsstadien	1,69	0,00	24,85
A XXIII 15. 11. 56	1. Unters., 27. 11. 56 3,5 Blatt	0,09	Eintrittsstellen	0,00	0,00	12,30
A XXIII	2. Unters., 17. 12. 56 Blüte	0,24	Hyphen wenig Verdauungsstadien	0,00	1,42	16,05
A XXIII	3. Unters., 9. 1. 57 reife Fr.	0,43	Hyphen wenig Verdauungsstadien	0,00	0,00	16,52

Die Erbsenwurzeln aus A (XV) und A (XV)² (Tab. 2) zeigen eine schwächere Verpilzung und kleinere Vesikelzahlen als der A XV-Versuch in der gleichen Erde. Pilzbefall und Vesikelzahl liegen parallel zu den entsprechenden Kontrollen aus dem Jahresversuch A XIX und A XXIII.

Vor der Blütezeit von A XIX und A (XV) sinkt die Lichtintensität auf einen Wert ≤ 35 cal je cm² in der Minute. Wie schon beim Jahresversuch erwähnt wurde, schaltet so schwache Sonneneinstrahlung die Verpilzung fast ganz aus. Falls eine Abnahme der infektiösfähigen Partikel im Boden in diesem Zeitraum erfolgt, so tritt sie also nicht in Erscheinung gegenüber dem viel stärkeren Einfluß der Sonneneinstrahlung während der vegetativen Entwicklung der Versuchspflanzen. Verpilzungsgrad und Vesikelzahl sind offensichtlich weitgehend von ihr bestimmt.

Tabelle 3. Zweimal bebaute Gartenerde
Versuche: A VIII A VIII W. Kontrolle aus dem Jahresversuch: A XIII

Versuch	Unters., Zeitpunkt Stadium	Verpil- zungs- grad D in Prozent	Eintrittsstellen Hyphen Verdauungsstadien	Vesikel- zahl D in Prozent	Außen- vesikel- zahl D in Prozent	Sproß Länge D in cm
A VIII 19. 4. 56	1. Unters., 3. 5. 56 3,5 Blatt	1,58	Hyphen Verdauungsstadien	,83	0,13	9,84
A VIII	2. Unters., 15. 5. 56 Blüte	6,31	Hyphen Verdauungsstadien	12,70	0,00	15,23
A VIII	3. Unters., 12. 6. 56 reife Fr.	8,95	Hyphen Verdauungsstadien	34,27	1,85	14,29
A VIII W 28. 6. 56	1. Unters., 10. 7. 56 3,5 Blatt	0,50	Hyphen Verdauungsstadien	3,09	1,03	8,87
A VIII W	2. Unters., 20. 7. 56 Blüte	2,97	Hyphen Verdauungsstadien	3,81	1,90	16,83 ¹
A VIII W	3. Unters., 16. 8. 56 reife Fr.	3,59	Hyphen Verdauungsstadien	11,00	12,00	17,78 ²
A XIII 28. 6. 56	1. Unters., 10. 7. 56 3,5 Blatt	0,23	Hyphen, wenig Verdauungsstadien	0,00	0,00	8,53
A XIII	2. Unters., 20. 7. 56 Blüte	0,89	Hyphen Verdauungsstadien	6,83	1,70	14,40
A XIII	3. Unters., 16. 8. 56. reife Fr.	5,80	Hyphen Verdauungsstadien	32,00	4,00	18,15

¹ Zwei Pflanzen ausgefallen.

² Eine Pflanze ausgefallen.

4. Zweimal bebaute Gartenerde

Weiter wurde untersucht, ob die Infektionsstadien des Bodens durch mehrmalige Bepflanzung vermehrt werden können, oder ob sie sich dabei erschöpfen.

Die Versuchserde des A VIII Jahresversuchs wurde jeweils nach den einzelnen Untersuchungen gesiebt und im Topf stehen gelassen bis zum Abschluß des ganzen Versuchs (10 Wochen). Die Erde wurde nur soviel gegossen, daß sie nicht ganz austrocknete.

Gleichzeitig mit der Kontrolle aus dem Jahresversuch A XIII wurde diese schon einmal mit *Pisum* bepflanzte Gartenerde wieder bepflanzt (Versuch A VIII W).

Verpilzungsgrad und Vesikelzahl der zweiten Bebauung A VIII W liegen aber für den ganzen Versuch (Tab. 3) tiefer als bei A VIII. Die Höhe des Verpilzungsgrades und der Vesikelzahl der Kontrolle aus dem Jahresversuch zu A VIII W, A XIII, sind ebenfalls geringer als bei A VIII aber höher als bei A VIII W.

Bei der Zweitbepflanzung tritt eine unterschiedlich starke Hemmung vor allem des Wurzelwachstums ein, die KLAPP (1951) auf „Bodenmüdigkeit“ zurückführt. „Die Erbse gilt als der am wenigsten verträgliche Hülsenfruchter.“ Das geschwächte Pflanzenwachstum hat bei A VIII W eine geringere Besiedlung mit dem Mycorrhizapilz zur Folge, verglichen mit A VIII und A XIII. Besonders auffallend ist der geringe Verpilzungsanstieg nach der Blüte. Er beträgt nur 0,62%, dagegen bei A XIII 4,91% und bei A VIII 2,64%. Die Zahl der Vesikel bei der ersten Untersuchung liegt bei A VIII W höher als bei den Kontrollen. Im weiteren Verlauf des Versuches liegt sie immer niedriger als bei A VIII und A XIII.

Diese relative Abnahme der Pilzinfektion mit zunehmendem Alter der A VIII W-Pflanzen geht parallel mit einem schon frühzeitig einsetzenden Absterben der Erbsenwurzeln, so daß bei der letzten Untersuchung nur noch ein spärliches Wurzelsystem vorhanden ist.

Bei einer zweiten Bebauung sind also Verpilzung der Wurzelrinde und Vesikelbildung im Durchschnitt geringer als bei der Erstbepflanzung und der entsprechenden Kontrolle aus dem Jahresversuch. Diese Hemmung der Mycorrhizaentwicklung ist begleitet und aller Wahrscheinlichkeit nach bedingt durch eine entsprechende Hemmung im Wachstum des Wurzelsystems. Über eine Beeinflussung der Infektionsstadien im Boden durch Mehrfachbepflanzung ist also keine Aussage zu machen.

B. Künstlich veränderte Böden

1. Sand-Gartenerde-Mischungen

Es wurde bereits erwähnt, daß es Boden von wechselndem Infektionsgrad gibt. Es soll nun versucht werden, einen Modellboden bestimmter Infektionsfähigkeit durch Mischen von normaler Versuchserde mit sterilem Sand herzustellen.

Gartenerde und Sand wurden im Verhältnis 2:1 (M_1) und 1:2 (M_2) gemischt, Verpilzung und Vesikelbildung der Erbsenpflanzen in diesen Modellböden mit der gleichzeitig angesetzten Kontrolle aus dem Jahresversuch, A VII, verglichen.

Die physikalischen Eigenschaften dieser Modellböden M_1 und M_2 , die von Art und Mengenverhältnis der verschiedenen Korngrößenklassen bestimmt werden, sind im Vergleich zum Kontrollboden verändert. Die Werte für das Porenvolumen (Abzug des Volumens fester Bestandteile vom Gesamtvolumen, KLAPP 1951) und die Werte für die Wasserkapazität (bestimmt nach KRAMER 1949) sind aus Tab. 4 ersichtlich. Bei geringerer Wasserkapazität haben die Modellböden M_1 und M_2 ein größeres Porenvolumen als der Kontrollboden.

Die Versuchspflanzen im M_1 -Gemisch sind im Durchschnitt zur Zeit der reifen Frucht (vgl. Tab. 5) 11,8 cm kleiner als die Kontrollpflanzen in Gartenerde (A VII). Bei den M_2 -Pflanzen liegt zur gleichen Zeit die

Tabelle 4. *Sand-Gartenerde-Mischungen*
Porenvolumen in Kubikzentimetern auf 100 cm³
Boden. Wasserkapazität in Gramm
auf 100 g abs. tr. Boden

	Porenvolumen	Wasserkapazität
Gartenerde	19,9	40,60
$\frac{2}{3}$ Erde $\frac{1}{3}$ Sand	27,6	20,65
$\frac{1}{3}$ Erde $\frac{2}{3}$ Sand	26,2	17,98
Sand	31,6	18,00

Sproßlänge nur 8,6 cm unter der Durchschnittslänge der Kontrollpflanzen. Die M_1 - und M_2 -Pflanzen wachsen — im Gegensatz zur Kontrolle — nach der Blütezeit nicht mehr (vgl. Tab. 5), was mit dem geringeren Nährstoffgehalt der Modellböden erklärt werden könnte.

Der Verpilzungsgrad D liegt bei der Jahreskontrolle im 3,5 Blatt-Stadium genau so hoch wie bei den Pflanzen in den Modellböden; bei den weiteren Untersuchungen liegt er bei A VII höher (vgl. Tab. 5).

Bei M_1 nimmt die Verpilzung kontinuierlich zu, sie bleibt jedoch zur Zeit der Blüte um 1,4⁰/₀ unter der Kontrolle und liegt bei Versuchsende

Tabelle 5. *Sand-Gartenerde-Mischungen*
Versuche: M_1 , M_2 ; Kontrolle aus dem Jahresversuch: A VII

Versuch	Unters., Zeitpunkt Stadium	Verpilzungs- grad D in Prozent	Eintrittsstellen Hyphen Verdauungsstadien	Vesikel- zahl D in Prozent	Außen- vesikel- zahl D in Prozent	Sproß- Länge D in cm
A VII 4. 4. 56	1. Unters., 19. 4. 56 3,5 Blatt	0,56	Hyphen, wenig Verdauungsstadien	0,00	0,00	11,03
A VII	2. Unters., 3. 5. 56 Blüte	5,67	Hyphen Verdauungsstadien	15,87	0,00	23,95
A VII	3. Unters., 25. 5. 56 reife Fr.	13,09	Hyphen Verdauungsstadien	56,73	0,00	27,75
M_1 4. 4. 56	1. Unters., 19. 4. 56 3,5 Blatt	0,76	Hyphen, wenig Verdauungsstadien	3,57	3,57	9,63
M_1	2. Unters., 3. 5. 56 Blüte	4,21	Hyphen Verdauungsstadien	3,49	4,49	16,04
M_1	3. Unters., 25. 5. 56 reife Fr.	9,60	Hyphen Verdauungsstadien	63,44	9,67	15,92
M_2 4. 4. 56	1. Unters., 19. 4. 56 3,5 Blatt	0,52	Hyphen, wenig Verdauungsstadien	3,70	0,92	9,64
M_2	2. Unters., 3. 5. 56 Blüte	1,96	Hyphen Verdauungsstadien	19,00	4,95	19,40
M_2	3. Unters., 25. 5. 56 reife Fr.	11,73	Hyphen Verdauungsstadien	75,83	23,33	19,15

um 3,5% tiefer. Die Erbsenpflanzen aus dem M₂-Gemisch dagegen zeigen zur Zeit der Blüte nur eine Verpilzung von 1,96% im Vergleich zu 5,67% bei der Kontrolle und 4,21% bei M₁. Zu Versuchsende unterscheidet sich ihr Verpilzungsgrad nur um 1,36% von dem der Kontrolle und liegt höher als bei M₁.

Die Zahl der Vesikel ist bei beiden Modellböden größer als bei der Kontrolle und hat während des ganzen Versuches die höchsten Werte bei M₂ (vgl. Tab. 5).

Die Verdünnung der Versuchserde mit Sand hat — wie die parallel dazu verlaufende Abnahme der prozentualen Verpilzung am Blühtermin zeigt — offenbar durch Abnahme der Zahl infektionsfähiger Partikel den Verpilzungsgrad der Wirtspflanze zurückgehalten. Zur Zeit der reifen Frucht ist die Verpilzung der M₂-Pflanzen fast so hoch wie in der Jahreskontrolle A VII. Ebenso steigt die Zahl der Vesikel, je mehr Sand der Modellboden enthält. Das deutet darauf hin, daß zwar die geringere Zahl der infektionsfähigen Partikel einen Einfluß auf die ersten Stadien der Verpilzung hat, es müssen aber außerdem die physikalischen Eigenschaften des Substrates, wie Wasserkapazität und Porenvolumen für den Verpilzungsgrad und besonders auch für die Vesikelbildung mitbestimmend sein, und zwar in stärkerem Maße als die Infektionskraft des Bodens.

2. Gartenerde mit Sand beschattet

Eine starke Verpilzung und reichliche Vesikelbildung wurde festgestellt, als gelegentlich die Versuchserde mit Sand beschattet wurde. Um dieser Beobachtung nachzugehen, wurden Erbsen in normaler Erde, die oben

Tabelle 6. *Gartenerde mit Sand beschattet*
Porenvolumen in Kubikzentimetern auf 100 cm³
Boden. Wasserkapazität in Gramm auf 100 g
abs. tr. Boden

	Porenvolumen	Wasserkapazität
Gartenerde	19,9	40,60
Gartenerde mit Sand beschattet	36,5	87,42

mit einer etwa 12 mm dicken Sandschicht abgedeckt war (Versuch So), aufgezogen.

Es ist bekannt, daß Beschattung des Bodens durch eine Sandschicht die Krümelstruktur der Gartenerde erhält, weil die nachteiligen Einwirkungen von Gießen, Sonne und Wind abgeschirmt werden, Verdunstung und Wärmeschwankung gemildert sind und so eine reiche Mikroben-tätigkeit bis in die oberste Bodenschicht ermöglicht ist. Diese Sonderform der „Gare“ nennt KLAPP (1951) „Schattengare“, sie findet in ähnlichen Formen auch in der Bodenbearbeitung Verwendung. Prüfen wir also wieder wie bei den Modellböden die physikalischen Eigenschaften der mit Sand beschatteten Erde.

Die Werte für Porenvolumen und Wasserkapazität der beschatteten Erde im Vergleich zur Gartenerde sind in Tab. 6 zusammengestellt. Der beschattete Boden hat also das größere Porenvolumen und die größere Wasserkapazität gegenüber der unbeschatteten Erde.

Die bessere Luftführung des beschatteten Bodens ließ ein besseres Wachstum von Sproß und Wurzeln erwarten (KRAMER 1949). So übertrifft dann auch bei den drei Versuchen (G I, G II, So) die Sproßlänge der Pflanzen bei weitem die der Kontrollen (vgl. Tab. 7 u. 8), und ebenso ist die prozentuale Verpilzung und Vesikelzahl während der ganzen Versuchszeit wesentlich höher als bei den Kontrollen (vgl. Tab. 7 u. 8).

Tabelle 7. *Gartenerde mit Sand beschattet*

Versuche: G I, G II; Kontrolle: GK II; Kontrollen aus dem Jahresversuch: A III, A XXI

Versuch	Unters., Zeitpunkt Stadium	Verpil- zungs- grad D in Prozent	Eintrittsstellen Hyphen Verdauungsstadien	Vesikel- zahl D in Prozent	Außen- vesikel- zahl D in Prozent	Sproß Länge D in cm
G I 6. 1. 56	1. Unters., 19. 1. 56 3,5 Blatt	0,54	Hyphen, wenig Verdauungsstadien	4,81	0,00	12,70
G I	2. Unters., 8. 2. 56 Blüte	17,50	Hyphen Verdauungsstadien	86,21	3,44	26,35
G I	3. Unters., 1. 3. 56 reife Fr.	32,89	Hyphen Verdauungsstadien	98,61	16,66	27,43
A III 6. 1. 56	1. Unters., 19. 1. 56 3,5 Blatt	0,94	Eintrittsstellen	0,00	0,00	11,98
A III	2. Unters., 8. 2. 56 Blüte	6,44	Hyphen Verdauungsstadien	37,07	0,00	24,89
A III	3. Unters., 1. 3. 56 reife Fr.	18,50	Hyphen Verdauungsstadien	86,51	1,06	23,59
G II 18. 10. 56	1. Unters., 1. 11. 56 3,5 Blatt	0,32	Hyphen, wenig Verdauungsstadien	0,00	0,00	11,42
G II	2. Unters., 15. 11. 56 Blüte	1,93	Hyphen Verdauungsstadien	11,01	3,39	24,44
G II	3. Unters., 5. 12. 56 reife Fr.	12,68	Hyphen Verdauungsstadien	83,48	22,01	27,26
GK II 18. 10. 56	1. Unters., 1. 11. 56 3,5 Blatt	0,25	Eintrittsstellen	0,00	0,00	11,41
GK II	2. Unters., 15. 11. 56 Blüte	0,52	Hyphen Verdauungsstadien	1,77	0,00	18,84
GKII	3. Unters., 5. 12. 56 reife Fr.	0,74	Hyphen Verdauungsstadien	6,89	0,86	18,60
A XXI 18. 10. 56	1. Unters., 1. 11. 56 3,5 Blatt	0,28	Hyphen, wenig Verdauungsstadien	0,00	0,00	10,36
A XXI	2. Unters., 15. 11. 56 Blüte	0,67	Hyphen Verdauungsstadien	3,95	0,00	17,14
A XXI	3. Unters., 5. 12. 56 reife Fr.	0,96	Hyphen Verdauungsstadien	9,00	0,00	20,16

Tabelle 8. *Gartenerde mit Sand beschattet*
Versuch: So; Kontrolle aus dem Jahresversuch: A XXIII

Versuch	Unters., Zeitpunkt Stadium	Verpilzungs-grad D in Prozent	Eintrittsstellen Hyphen Verdauungsstadien	Vesikel-zahl D in Prozent	Außen-vesikel-zahl D in Prozent	Sproß Länge D in cm	Frucht Länge D in cm	Frischgw. d. Sprosses D in g	Trockengew. d. Sprosses D in g
So 15. 11. 56	1. Unters. 27. 11. 56 3,5 Bl.	0,29	Eintrittsstellen	0,00	0,00	14,20		1,05183	0,09996
So	2. Unters. 17. 12. 56 Blüte	2,31	Hyphen Verdauungsstadien	5,22	3,47	28,15		1,97705	0,19077
So	3. Unters. 9. 1. 57 reife Fr.	3,30	Hyphen Verdauungsstadien	10,37	13,20	31,30	4,03	2,07645	0,25391
A XXIII 15. 11. 56	1. Unters. 27. 11. 56 3,5 Bl.	0,09	Eintrittsstellen	0,00	0,00	12,30		0,83556	0,07335
A XXIII	2. Unters. 17. 12. 56 Blüte	0,24	Hyphen wenig Verdauungsstadien	0,00	1,42	16,05		0,98639	0,09690
A XXIII	3. Unters. 9. 1. 57 reife Fr.	0,43	Hyphen wenig Verdauungsstadien	0,00	0,00	16,52	3,03	1,22747	0,13687

Im Versuch G I nimmt die Verpilzung von der ersten bis zur dritten Untersuchung kontinuierlich zu, bei A III dagegen ist die größte Zunahme der Verpilzung und Vesikelzahl zwischen Blüte und reifer Frucht. Die größte Vesikelzunahme ist bei G I vor der Blütezeit. Zu Versuchsende sind die Erbsenwurzeln im mit Sand beschatteten Substrat um 14,39% mehr verpilzt und haben 12,10% mehr Vesikel als die Kontrollen (vgl. Tab. 7).

Bei G II findet die größte Zunahme der Verpilzung und Vesikelzahl erst nach der Blüte statt; die Verpilzung und Vesikelbildung der Kontrollen (A XXI) geht fast gleichmäßig vor sich. Zur Zeit der reifen Frucht liegt die Verpilzung der Pflanzen mit beschattetem Substrat um 11,72% und die Zahl der Vesikel um 74,48% höher als bei A XXI (vgl. Tab. 7).

Versuch So zeigt bei gleichmäßigem Verpilzungsanstieg der Kontrolle die Hauptzunahme der Verpilzung vor der Blütezeit. Die Zahl der Vesikel nimmt gleichmäßig zu. So ist zu Versuchsende nur um 2,87% höher verpilzt als A XXIII. Die So-Erbsenwurzeln enthalten bei der dritten Untersuchung 10,37% Vesikel, wogegen in den Kontrollwurzeln keine Vesikelbildung festgestellt werden konnte (vgl. Tab. 8). Der Unterschied im Habitus der So-Pflanzen und der Kontrollen A XXIII kommt im Frisch- und Trockengewicht (vgl. Tab. 8) deutlich zum Ausdruck.

Die verschiedenen hohen Verpilzungsgrade der drei mit Sand beschatteten Versuche untereinander sind aus den jahreszeitlich bedingten Schwankungen der Lichtintensität (siehe Jahresversuch) zu erklären.

Also zeigen auch die Versuche in mit Sand beschatteter Gartenerde wieder, daß die Bodenstruktur für die Entwicklung der Mycorrhiza von ausschlaggebender Bedeutung ist. Bei dieser Versuchsgruppe wird aber auch besonders deutlich, wie sehr kräftiges Wachstum der Versuchspflanze mit starker Verpilzung und reichlicher Vesikelbildung verbunden ist. Ganz offensichtlich ist eine kräftige Wirtspflanze Vorbedingung für eine gut entwickelte Mycorrhiza.

Zum Abschluß dieses Kapitels können wir also zusammenfassen: Infektionsträger für Erbsenmycorrhiza ist Garten- und Waldboden nur im durchwurzelten Bereich. Die Bodenstruktur, seine Wasserkapazität und Porengröße, sind für die Entwicklung der Pilzinfektion in der Wirtspflanze wesentlicher als die Zahl seiner infektionsfähigen Stadien. Ob die physikalischen Eigenschaften des Substrates auch einen direkten Einfluß auf die Ausbreitung des Pilzmycels in der Erbsenwurzel haben, oder ob sie sich nur über das Wachstum der Wirtspflanze äußern, ist nach den vorliegenden Versuchen nicht zu entscheiden. Außer der Bodenstruktur konnte die Intensität der Sonneneinstrahlung als ausschlaggebender Faktor für die Entwicklung der Mycorrhiza in der Erbsenwurzel erkannt werden.

III. Die Biologie der Erbsenmycorrhiza

A. In der Wurzel

1. Hyphen

Durch das reichliche Anschauungsmaterial der beschriebenen Versuche erhielten wir immer wieder Einblick in den Ablauf eines solchen Pilzbefalls. Haupt- und Nebenwurzeln können vom Mycorrhizapilz bis fast zur Wurzelspitze besiedelt werden. Die immer unseptierten Hyphen wachsen meistens durch Wurzelhaare (Abb. 2), seltener durch Epidermiszellen (Abb. 3), nicht an vorgeschriebenen Stellen (vgl. DEMETER 1923, McLENNAN 1926) in die Wurzel ein.

Der vorherrschende Hypheneintritt durch Wurzelhaare könnte aus deren großer Zahl und daher großer Oberfläche erklärt



Abb. 2. Hypheneintritt durch ein Wurzelhaar

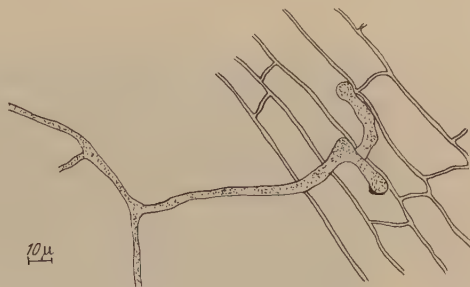


Abb. 3. Früher Hypheneintritt durch die Epidermis

werden. Die Wurzeloberfläche von *Pisum* wird durch die Wurzelhaare um das Zwölffache erhöht (vgl. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen 26. Aufl. S. 97). Die Dicke der eintretenden Hyphen ist außerhalb und innerhalb der Wurzel gleich und liegt zwischen $4,8\mu$ und $10,9\mu$. An der Eintrittsstelle haben die Hyphen häufig eine kleine Verdickung (vgl. Abb. 2). Gleich nach dem Eintritt haben sie die Tendenz, sich sehr stark zu verzweigen und in tiefere Rindenschichten einzudringen. Die von vielen Autoren (McLENNAN 1926, WINTER 1951, SIEVERS 1953) bei anderen Pflanzen beschriebene Aufknäuelung gleich in den äußeren Rindenschichten konnte nicht beobachtet werden. Die Hyphen verlaufen intracellulär oder intercellulär.

2. Arbuskel und Sporangiolen

Erst in tieferen Rindenschichten, den sogenannten Verdauungsschichten, nahe der Endodermis, bilden intracelluläre Hyphenenden die von GALLAUD (1905) zum ersten Mal beschriebenen Arbuskel (Abb. 4).

Das sind — wegen der Kleinheit nur undeutlich zu erkennende — einmal dichotom verzweigte Hyphenenden, die von einer Unzahl kleiner, das Zellumen ausfüllender Körnchen mehr oder weniger verdeckt werden. Das Wachstum der einmal in eine Zelle eingetretenen Hyphe ist nach Arbuskelbildung beendet. Die Erbsenmycorrhiza bildet nur die von GALLAUD als „Arbuscules simples“ bezeichneten Stadien aus. Die „Arbuscules composées“, bei denen ein Weiterwachsen der Hyphe, die schon Arbuskel gebildet hat, möglich ist, fehlen.



Abb. 4. Arbuskel

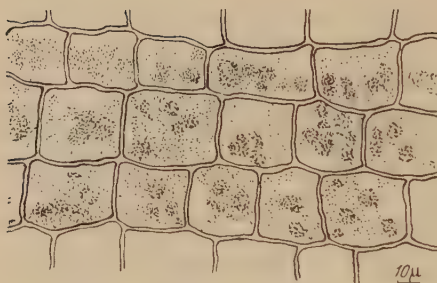


Abb. 5. Sporangien

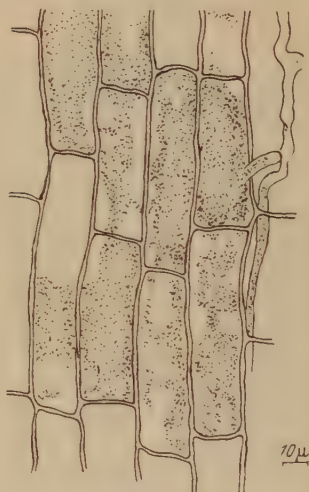


Abb. 6. Spätes Verdauungsstadium

Nur die intercellulare Hyphe wächst weiter, um neue Verzweigungen in andere Zellen zu schicken, wo sich die Arbuskelbildung wiederholt.

Nach einer gewissen Zeit haben sich diese eiweißreichen Plasmamassen des Pilzes — unter Vergrößerung und Zunahme der Färbbarkeit von Nucleus und Nucleolus (vgl. McLENNAN 1926, M. STAHL 1949) der befallenen Zelle und Verschwinden der Hyphenkonturen in der Verdauungsschicht — zu größeren Klumpen zusammengeballt, die JANSE (1897) als „Sporangien“ bezeichnet (Abb. 5). BURGEFF (1943) nennt sie „geformte Exkrete“. Schließlich verschwinden auch diese immer mehr und es ist nur noch eine fein verteilte, mit Hämatoxylin noch immer färbare Wolke zu erkennen (Abb. 6). Die Plasmolysierbarkeit der Zelle bleibt während der ganzen Zeit erhalten, wie auch GERN (bei BURGEFF 1943 erwähnt) feststellte.

3. Vesikel

Intercellular entstehen gleichzeitig mit der Arbuskelbildung an den Hyphenenden plasmareiche, von den Hyphen nicht abgegrenzte Anschwellungen, die Vesikel. Sie sind zu allen Jahreszeiten gleich nach Form und Inhalt (vgl. M. STAHL 1949 im Gegensatz zu SKEPPSTEDT



Abb. 7. Terminale Vesikel

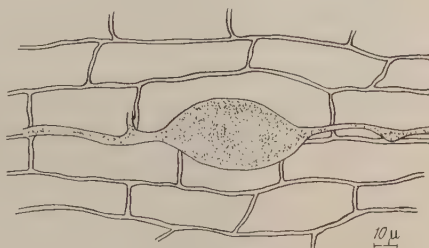


Abb. 8. Interkalares Vesikel

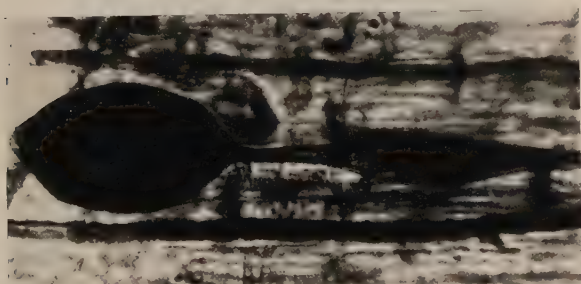


Abb. 9. Zwei Vesikelbildungen hintereinander. 392mal vergr.

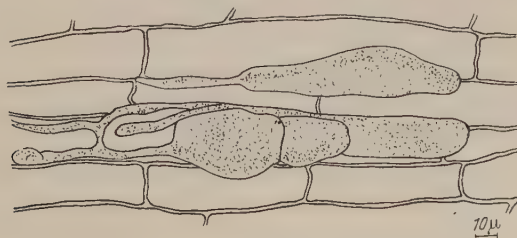


Abb. 10. Mehrere Vesikel in einer Intercellulare

1952). Sie pressen — manchmal zu mehreren — die Intercellularen auseinander und nehmen dann den ganzen erweiterten intercellularen Raum ein (vgl. JANSE 1897, McLENNAN 1926). Vesikel können an Hyphenenden, also terminal, entstehen (Abb. 7), man findet aber ebenso häufig interkalare Vesikel (Abb. 8). In einigen Fällen konnten sogar zwei Vesikelbildungen hintereinander an einer Hyphe gesehen werden (Abb. 9). In

Form und Größe variieren sie nach der Lage von etwa $53\mu \times 56\mu$, $14\mu \times 53\mu$ bis $26\mu \times 102\mu$ (vgl. Abb. 10). Der Inhalt wird von einer körnigen, eiweißreichen, ziemlich einheitlichen Substanz gebildet,

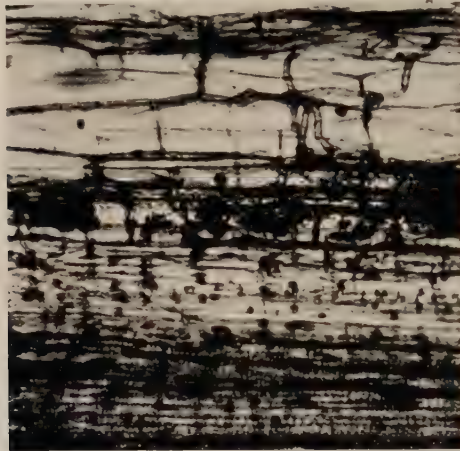


Abb. 11a. Übersicht über die Lage der Pilzstadien im Wurzelgewebe. 178,5 mal vergr.

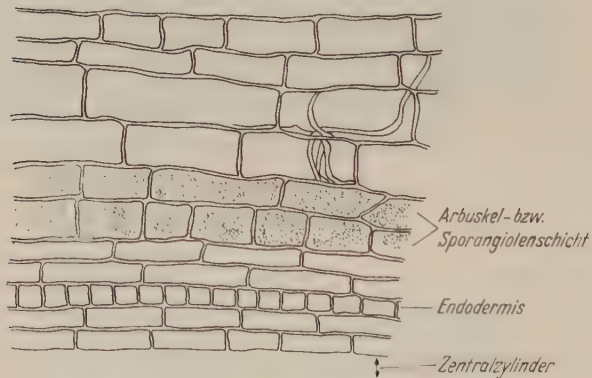


Abb. 11b. Schema zur Verdeutlichung von Abb. 11a

in der niemals Kerne beobachtet werden konnten (im Gegensatz zu VAN DER PLIJL 1934, MAGROU 1946 und SKEPPSTEDT 1952). Die Vesikel liegen in den Rindenschichten zwischen Arbuskel- bzw. Sporangiolenschicht und Epidermis (Abb. 11a u. b). Nur wenn die Rinde mit Vesikeln überschwemmt ist, kommen in der Verdauungsschicht, nahe der Endodermis, Vesikel vor. Die Wand der Vesikel wird mit der Zeit etwas fester, ist aber nicht wahrnehmbar verdickt.

4. Die systematische Einordnung der Erbsenmycorrhiza

Nach der Methode von VAN WISSELINGH (1898) konnte in Übereinstimmung mit SHIBATA (1902), VAN DER PIJL (1934), REED u. FREMONT (1935), SKEPPSTEDT (1952) und anderen Autoren gezeigt werden, daß die Membran des Endophyten aus Chitin besteht. Diese von NABEL (1939) für *Zygomyceten* und *Endogone*-Arten bewiesene Tatsache und die Querwandlosigkeit des Mycel läßt die Annahme gerechtfertigt erscheinen, daß diese endotrophe Mycorrhiza zur Familie der *Endogonaceen* gehört (PEYRONEL 1923, BURGEFF 1943 u. a.). Sie wird die „phycomycetoide Mycorrhiza“ genannt. Mit ihrer Thamniscophagie (= Bäumchenverdauung BURGEFFS, 1943) hat sie die weiteste Verbreitung bei grünen Pflanzen, Lebermoosen und Farnen aller Art.

5. Die Ausbreitung der Pilzinfektion in einem Wurzelsystem

Es interessiert die Frage, wie weit sich eine Pilzinfektion in einem Wurzelsystem ausbreitet, speziell ob ein Hinüberwachsen der Pilzhypen von einer Seiten- oder Adventivwurzel über die Hauptwurzel in eine andere Adventivwurzel möglich ist.

Die Keimwurzel einer in sterilem Sand aufgezogenen Erbsenpflanze wurde abgeschnitten und das Pflänzchen in einen Blumentopf gesetzt, in welchem Sand von infektiöser Erde durch eine Plexiglasscheibe getrennt war. Oben war der ganze Topf mit einer etwa 12 mm dicken Schicht mycorrhizasterilen Sandes zugedeckt.

Die in der Topfhälfte mit Sand entwickelten Adventivwurzeln blieben steril, obwohl sie in der infektiösen Erde (Versuch G I) eine überraschend hohe Verpilzung und Vesikelzahl im Vergleich zur Kontrolle aus dem Jahresversuch (A III) zeigten. Ein entsprechender Versuch (G II) zu anderer Jahreszeit brachte das gleiche Ergebnis. Die beiden getrennten Hälften des Wurzelsystems verhalten sich also wie die Wurzelsysteme zweier Erbsenpflanzen. Bei ähnlicher Versuchsanordnung in Nährlösung beschreibt GÄUMANN (1945) das gleiche Ergebnis für die Ausbreitung von *Bacterium radicola*. Die Infektion bleibt also relativ lokal, ein Überwandern des Mycorrhizapilzes über die Hauptwurzel erfolgt nicht. Es müssen also Infektionen an sehr vielen Stellen des Wurzelsystems erfolgen, die auch in großer Zahl beobachtet werden konnten.

Nun aber ist zu entscheiden, in welchem Stadium der Pilz außerhalb des Wurzelgewebes lebt.

B. Außerhalb der Wurzel

1. Beobachtungen an Infektionsversuchen in mycorrhizasterilem Sand

Um das für die Infektion verantwortliche Pilzstadium zu ermitteln, wurde die Infektion von Erbsenwurzeln in mycorrhizasterilem Sand nach zwei Methoden versucht: a) durch Zugabe alter verpilzter Wurzeln zum

Substrat; b) durch Bestreichen der unverpilzten jungen Wurzeln mit einer Verreibung von infiziertem Wurzelgewebe und Sand.

Wenige Tage nach der Infektion konnte immer schon ein Eindringen der Infektionsschläuche von *Bacterium radicola* in die jungen Wurzeln beobachtet werden mit anschließender Ausbreitung des Symbionten.

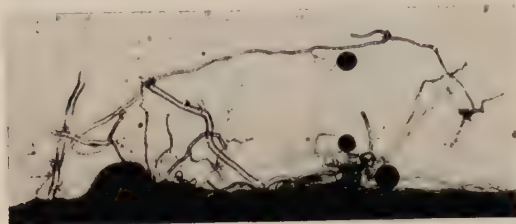


Abb. 12. Außenvesikel an altem Wurzelgewebe. 90mal vergr.

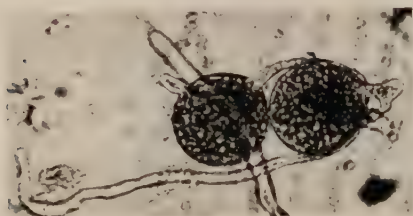


Abb. 13. Außenvesikel. 392mal vergr.

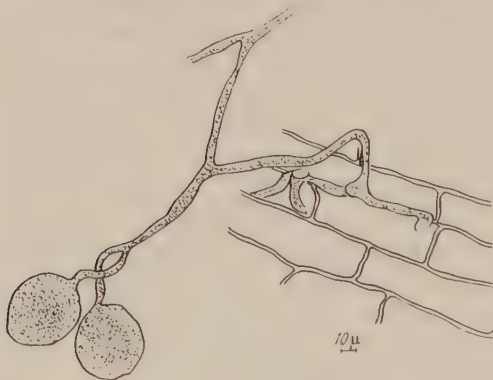


Abb. 14. Außenvesikel mit Hypheneintritt in junges Wurzelgewebe

Die Infektion nach der ersten Methode hat den Vorteil, daß man neben der Untersuchung der jungen infizierten Pflanzen gleichzeitig die Verpilzung und Weiterentwicklung des Pilzbefalls bei den zur Infektion benutzten alten Wurzeln beobachten kann.

Doch der Nachteil, den die Zugabe alter Wurzeln zu den Jungpflanzen hat, darf nicht unerwähnt bleiben: Eine Hemmung des Sproß- und Wurzelwachstums, wie sie nach dem Ergebnis der Versuche in 2mal bebauter Erde zu erwarten ist, trat auch hier ein. Diese Hemmwirkung trat unabhängig vom Mycorrhizabefall ein. Die Versuchspflanzen waren mehr oder weniger stark von einer Welkekrankheit befallen, so daß einige Infektionsversuche gar nicht ausgewertet werden konnten.

Infektionswurzeln und zu infizierende Wurzeln

wurden getrennt fixiert, gefärbt, eingebettet und mikroskopisch untersucht.

Bei den Schnitten von infizierten Wurzeln und vor allem in den Totalpräparaten von alten Infektionswurzeln fielen runde, vesikelartige, verschieden große Gebilde mit Hyphen, sowie isolierte Hyphenstränge (vgl. BUSICH 1913, PEYRONEL 1924, BURGEFF 1943 und NEILL 1944) außerhalb der Wurzeln (Abb. 12 u. 13) auf. Häufiger konnte das Einwachsen einer solchen Hyphe mit Vesikel in eine Erbsenwurzel gesehen werden (Abb. 14). Solche „Außenvesikel“, die in ihrer Inhaltskonsistenz

und Färbbarkeit mit Hämatoxylin an die Innenvesikel erinnern, aber eine ausgesprochene Kugelform mit sehr unterschiedlichem Durchmesser haben ($12,2 \mu \times 14,7 \mu$; $17,1 \mu \times 17,1 \mu$; $65,9 \mu \times 70,7 \mu$), scheinen danach Infektionsstadien bzw. Dauerstadien zu sein.

Das Vorkommen solcher Hyphen und Außenvesikel — oder von Hyphensträngen — wurde in den beiden erwähnten Infektionsversuchen verfolgt und zahlenmäßig festgelegt, und zwar am Infektionstag und dann weiter an den in Tab. 9 angegebenen Terminen. Reichliche Hyphen- und Außenvesikelbildung bei den als Infektionsträger benutzten Wurzeln, führte schon früh zu Mycorrhizabildung bei den jungen Wurzeln. Alte Wurzeln, mit geringer Verpilzung und vor allem wenig Hyphen und Außenvesikeln in der Umgebung des Wurzelgewebes, riefen erst lange nach dem Infektionstermin eine schwache Verpilzung der jungen Erbsenwurzeln hervor.

Bei den nach der zweiten Methode infizierten Erbsenwurzeln war die Hemmwirkung des fein verteilten mit Sand verriebenen alten Wurzelgewebes gering. Es entfällt nun die Möglichkeit, die Hyphenverbindungen zwischen den Infektionswurzeln und den Wurzeln der Jungpflanzen mikroskopisch zu beobachten (Tab. 10). Der Zeitpunkt der ersten Infektion, sowie Verpilzungsgrad und Vesikelzahl der jungen infizierten Wurzeln, waren in etwa von Verpilzungsgrad und Vesikelzahl der Infektionswurzeln abhängig. Stark verpilzte Wurzeln mit Außenvesikelbildung erreichten früher eine stärkere Verpilzung und Vesikelbildung in den jungen Wurzeln als die nur wenig verpilzten Infektionswurzeln ohne Außenvesikel.

2. Beobachtungen an alten, verpilzten, in steriles Substrat eingebetteten Wurzeln

Die Außenvesikel sind als Infektionsträger im Boden wahrscheinlich gemacht. Um einen Zusammenhang zwischen Innen- und Außenvesikeln zu finden, soll das Schicksal der Innenvesikel in alten verrotteten Erbsenwurzeln weiter verfolgt werden.

Dazu wurden verpilzte Wurzelsysteme ausgereifter Erbsenpflanzen vom Sproß abgeschnitten und in Blumentöpfe mit einem Gemisch von steriler Erde und sterilem Sand 1:1 eingebettet. Die Hälfte der Versuchstöpfe wurde mit Erbsen bepflanzt, die übrigen blieben unbepflanzt. Alle Töpfe wurden regelmäßig begossen. Sproß- und Wurzelwachstum der Jungpflanzen waren wieder durch die beigepflanzten alten Wurzeln deutlich gehemmt.

Von den alten infizierten Wurzelsystemen aus dem Sand-Erde-Gemisch mit und ohne Jungpflanzen wurden nach 14, 32 und 56 Tagen je 10 in CrO_3 fixiert, ungefärbt total eingebettet und mikroskopisch untersucht (Tab. 11 V I⁺ und V I⁻).

Im bepflanzen Substrat konnten nach 32 Tagen — zur Zeit der Blüte der Jungpflanzen — außerhalb des alten zerfallenden Wurzelgewebes Vesikel mit Hyphen und der typischen von Interzellularen geprägten Form als Innenvesikel erkannt werden (Abb. 15, 16). Sie zeigten noch die

Tabelle 9. *Infektionsversuche in mycorrhizasterilem Sand*
(nach Methode a infiziert)

Versuchs- beginn Infektions- tag	Unters. Tage nach der Infektion	Zahl der unter- suchten Pflanzen	infiizierte Wurzeln				Infektions- methode	Infektionswurzeln (am Infektionstag)				Infektionswurzeln (zus. mit jungen Wurzeln unters.)			
			Ver- pflzung o/o	Vesikel o/o	Außen- vesikel o/o	Außen- hyphen o/o		Ver- pflzung o/o	Vesikel o/o	Außen- vesikel o/o	Außen- hyphen o/o	Ver- pflzung o/o	Vesikel o/o	Außen- vesikel o/o	Außen- hyphen o/o
15. 8. 55	22 Knospe	1	0,4	0,0	0,0	25,0	Zugabe alter verpilzter Wurzeln zum Substrat	24,8	20,0	—	+	100,0	100,0	66,6	100,0
	25 Knospe	1	0,0	0,0	0,0	0,0						33,3	33,3	0,0	66,6
	29 Blüte	1	2,7	25,0	0,0	100,0						100,0	33,3	33,3	100,0
	36 beg. Fr.	3	0,3	0,0	16,6	66,6						75,0	25,0	100,0	100,0
	43 reife Fr.	4	3,9	16,6	0,0	66,6						50,0	66,6	0,0	100,0
26. 8. 55	18 3,5 Bl.	1	0,0	0,0	0,0	0,0	Zugabe alter verpilzter Wurzeln zum Substrat	38,7 ¹	33,3	+	+	50,0	25,0	0,0	50,0
	25 Knospe	1	0,0	0,0	0,0	0,0		45,0 ¹	33,3	+	+	0,0	0,0	0,0	0,0
3. 9. 55	32 Blüte	2	1,5	33,3	33,3	100,0						66,6	16,6	33,3	100,0
	34 beg. Fr.	2	0,8	0,0	0,0	0,0						100,0	50,0	50,0	100,0
	39 reife Fr.	2	1,9	33,3	16,6	50,0						33,3	33,3	16,6	100,0

¹ Diese gleichalten, verschiedenen stark verpilzten Infektionsswurzeln wurden gemischt.
Bemerkung: Alle Pflanzen sind von einer Welkekrankheit befallen.

Tabelle 10. *Infektionsversuche in mycorrhizasterilem Sand*
(nach Methode b infiziert)

Versuchs- beginn nach der Infektions- tag	Unters. Tage nach der Infektion	Zahl der unter- suchten Pflanzen	infizierte Wurzeln				Infektions- methode	Infektionswurzeln (am Infektionstag)			
			Verpilzung %	Vesikel %	Auß.-ves. %	Auß.-hyph. %		Verpilzung %	Vesikel %	Außen- vesikel	Außen- hyphen
5. 7. 55	21 3,5 Bl.	1	0,0	0,0	0,0	0,0	junge Wurzeln mit einer Verreibung von infiziertem Wurzel- gewebe mit Sand bestrichen	36,3	20,0	—	—
	27 Blüte	2	0,0	0,0	0,0	0,0					
18. 7. 55	29 Blüte	2	0,0	0,0	0,0	0,0					
	36 verblüht	2	0,0	0,0	0,0	0,0					
	38 beg. Fr.	2	0,4	0,0	0,0	0,0					
	41 reife Fr.	2	0,0	0,0	0,0	60,0					
	48 reife Fr.	2	0,6	0,0	0,0	33,3					
	51 reife Fr.	2	1,8	33,3	0,0	66,6					
5. 8. 55	17 3,5 Bl.	1	0,0	0,0	0,0	25,0	junge Wurzeln mit einer Verreibung von infiziertem Wurzel- gewebe mit Sand bestrichen	73,9	80,0	+	+
	21 4 Bl.	1	1,3	0,0	0,0	0,0					
11. 8. 55	25 Blüte	2	0,3	0,0	0,0	25,0					
	28 beg. Fr.	2	5,3	100,0	0,0	50,0					
	31 beg. Fr.	2	11,9	100,0	0,0	75,0					
	32 reife Fr.	2	1,1	0,0	0,0	0,0					
	33 reife Fr.	2	0,0	0,0	0,0	0,0					

typische Lagerung, die ihnen im Wurzelparenchym eigen ist (vgl. Abb. 15); es haften ihnen häufig noch Membranfetzen der Wirtszellen an (Abb. 16). Im unbepflanzten Substrat dagegen waren erst nach 56 Tagen Innenvesikel außerhalb des Wurzelgewebes zu sehen.

Tabelle 11. *Versuche mit alten verpilzten Wurzeln*

V I⁺ alte verpilzte Wurzeln in bepflanzttem Substrat Sand-Erde steril 1:1. V I⁻ alte verpilzte Wurzeln in unbepflanztem Substrat Sand-Erde steril 1:1. V II⁻ alte verpilzte Wurzeln in unbepflanztem Substrat Erde steril

Versuch	Unters. Zeitp. Stadium	Unters. nach Tagen	alte Wurzeln			alte Wurzeln (zu Versuchsbeginn)			
			Vesikel- zahl D in Prozent	Innen- ves. zahl außen D in Prozent	Außen- ves.- zahl D in Prozent	Verpil- zungs- grad D in Prozent	Vesikel- zahl D in Prozent	Außen- vesikel- zahl D in Prozent	Außen- hyphen
V I ⁺ 3.5.56	1. Unters. 17. 5. 56 3,5 Blatt	14	10,31	0,00	0,00	14,27	17,57	1,51	+
	2. Unters. 4. 6. 56 Blüte	32	16,06	3,56	0,00				
	3. Unters. 28. 6. 56 reife Fr.	56	16,11	3,22	3,22				
V I ⁻ 3.5.56	1. Unters. 17. 5. 56	14	7,15	0,00	0,00				
	2. Unters. 4. 6. 56	32	10,76	0,00	0,00				
	3. Unters. 28. 6. 56	56	18,75	1,55	0,00				
V II ⁻ 31.5.56	1. Unters. 17. 7. 56	47	45,58	8,82	2,94	13,09	56,73	0,00	+
	2. Unters. 4. 9. 56	96	65,00	15,00	20,00				

Im bepflanztten Substrat verrotteten die Erbsenwurzeln rascher als im unbepflanzten. Die in Tab. 13 für V I⁺ zu Versuchsende angegebene Außenvesikelzahl spricht nicht unbedingt für eine Zunahme dieser Infektionsstadien im Verlauf des Versuches. Der Unterschied der Außenvesikelzahlen der alten Wurzeln zu Versuchsbeginn (1,5%) und der Versuchswurzeln (3,2%) ist zu gering und kann im unterschiedlich verpilzten Material begründet sein. Außerdem war die Innenvesikelzahl der Infektionswurzeln niedrig und eine Versuchszeit von 56 Tagen für die Außenvesikelbildung vielleicht zu kurz. Deshalb wurden in einem weiteren Versuch gut verpilzte alte Wurzeln mit reichlicher Innenvesikelbildung in sterile Erde eingebettet und erst nach 47 und 96 Tagen fixiert und untersucht (vgl. Tab. 11 V II⁻).

Neben einer Vielzahl von Innenvesikeln außerhalb des Wurzelgewebes waren an verschiedenen Stellen, wo noch Reste der Erbsenwurzeln mit teilweise aufgelösten Zellwänden vorhanden waren, verschieden geformte Innenvesikel mit intakten Wänden und Zellinhalt an Hyphenverbindungen zu sehen, die aus dem alten Wirtsgewebe herausfielen (Abb. 17 a u. b). Wo die Wurzelrinde bis zum Zentralzylinder schon abgestoßen war, konnten häufig neben dem Leitgewebe, im Bereich des Rindenparenchyms, Innenvesikel mit Hyphen beobachtet werden (Abb. 18).

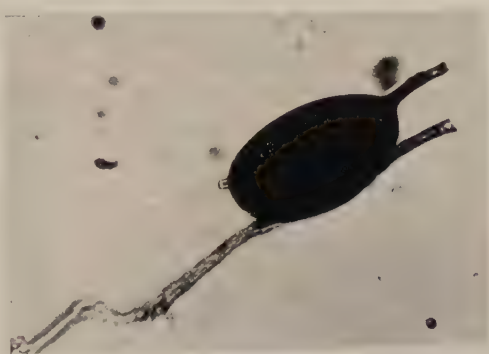


Abb. 15.
Altes Innenvesikel mit auswachsender Hyphe. 366 mal vergr.

Die Zunahme der Außenvesikel im Versuch V II⁻ von 2,9% nach 47 Tagen auf 20,0% nach 96 Tagen spricht für eine Zunahme dieser infekionsfähigen Partikel im Boden. Die größere Zahl der Außenvesikel in diesem zweiten Versuch in steriler Erde (V II⁻) im Vergleich zu dem ersten (V I⁺, V I⁻) im sterilen Sand-Erde-Gemisch ist wohl auf die

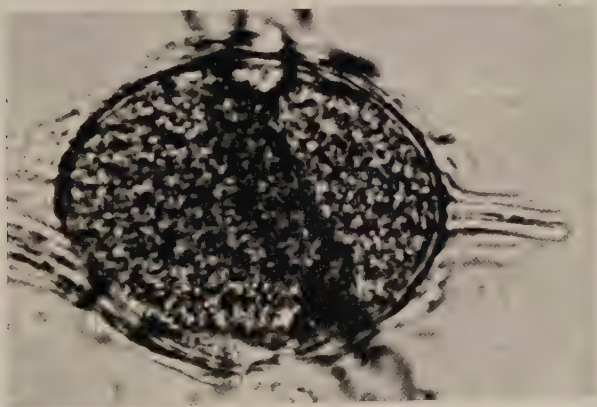


Abb. 16. Altes Innenvesikel mit Membranfetzen der Wirtszellen. 755 mal vergr.

höhere Vesikelzahl der Infektionswurzeln und die längere Versuchszeit — 96 Tage — zurückzuführen. Nur allmählich wird die Rinde des alten Wurzelgewebes abgestoßen und Innenvesikel mit ihrer widerstandsfähigen Chitinmembran gelangen wieder in den Boden.

Besteht nun ein Zusammenhang zwischen den aus der Wurzelrinde stammenden Innenvesikeln und den immer nur im Boden beobachteten

Außenvesikeln? Diese Frage müßte durch vorsichtiges Untersuchen der benutzten Versuchserde zu klären sein.

3. Bodenaufschwemmungen

Bodenproben, in ein Stück Körper eingewickelt, wurden in CrO_3 fixiert, ausgewaschen und mit Hämatoxylin gefärbt, dann in Wasser aufgeschwemmt und mikroskopisch untersucht.

Außenvesikel in Verbindung mit Hyphen (Abb. 19) und unabhängig davon Innenvesikel konnten in jeder



Abb. 17 a. Vesikel fallen aus aufgelöstem Wurzelgewebe heraus. 154,5 mal vergr.



Abb. 17 b.
Ausschnitt aus 17 a. 490,5 mal vergr.

Probe festgestellt werden, leider nie deren Zugehörigkeit. Offensichtlich ist die Behandlung der Erdproben zu grob.

4. Wurzeln in infektiösem Substrat

Es wurden deshalb die Wurzelpräparate der in Kapitel II beschriebenen Versuche durchgesehen. In den mechanisch geschützten Räumen zwischen Wurzel und Wurzelhaaren lagen dann auch die gesuchten Stadien. An einem Innenvesikel — die immer an der Form zu erkennen sind — hängen mit Hyphenverbindungen aus diesem gebildete Außenvesikel verschiedener Größe (Abb. 20). Das alte Innenvesikel ist im Vergleich zu den Außenvesikeln nur noch weniger intensiv mit Hämatoxylin färbbar und beginnt sich von der Membran her aufzulösen. Zahlreiche solche Innen- und Außenvesikel in der Umgebung des Wurzelgewebes wurden bei der Zweitbepflanzung der Gartenerde von A VIII (A VIII W) gefunden. Die Zahl der Außenvesikel nimmt im Laufe des Versuches zu (vgl. Tab. 3).

Besonders häufige Außenvesikelbildung wurde in den Modellböden M_1 und M_2 beobachtet (vgl. Tab. 5). Sie steigt stetig während der ganzen Versuche. Dasselbe gilt für die Versuche in beschatteter Gartenerde (vgl. Tab. 7 u. 8). In beiden Fällen liegen die Außenvesikelzahlen immer höher als bei den Kontrollen. Daraus ist zu folgern, daß die Entstehung von Außenvesikeln ebenfalls abhängig ist von der Bodenstruktur, wahrscheinlich also von der Belüftung des Substrates.



Abb. 18. Vesikel und Hyphen in altem aufgelöstem Wurzelgewebe



Abb. 19. Außenvesikel mit Hyphen im Boden.
129mal vergr.



Abb. 20. Altes Innenvesikel mit ausgewachsenen Außenvesikeln

Die Untersuchungsergebnisse von Kapitel III können in Abb. 21 zu einem Schema zusammengefaßt werden: Die aus alten Wurzelrinden persistierenden Innenvesikel I treiben Hyphen, an deren Enden Außenvesikel entstehen (II), die Neuinfektionen an Wurzelhaaren und Epidermis-

zellen ausführen (III). In den inneren Wurzelrindenschichten entstehen Arbuskel (IV) und später Sporangiolen (V). Gleichzeitig bilden sich im äußeren Wurzelparenchym intercellulär die Innenvesikel VI. So schließt sich der Cyclus der vegetativen Vermehrung der phycomycetoiden Erbsenmycorrhiza.

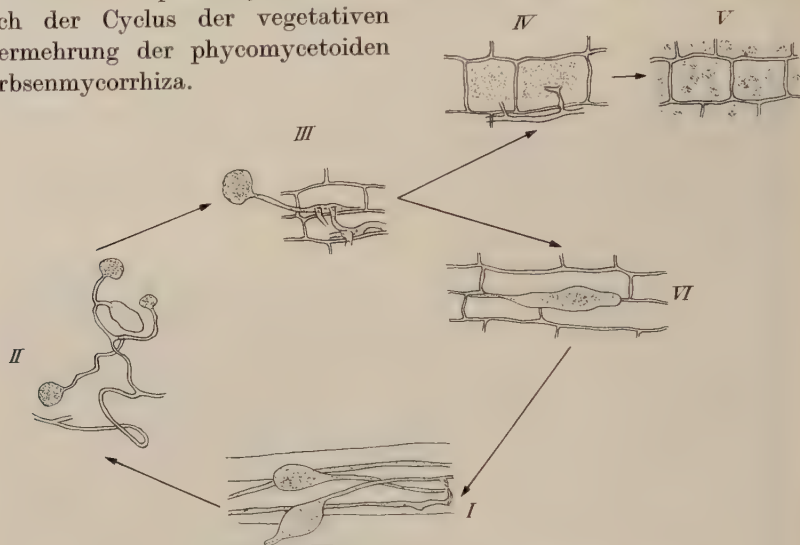


Abb. 21. Cyclus der vegetativen Vermehrung der Erbsenmycorrhiza

IV. Die Außenvesikelzahl und ihre Bedeutung für Verpilzungsgrad und Vesikelzahl

A. Böden aus dem Freiland

Nachdem das für die Infektion mit Erbsenmycorrhiza verantwortliche „Außenvesikel-Stadium“ und seine Entstehung bekannt sind, wird verständlich, warum nur Erde aus dem durchwurzelter Bereich infektiös ist. Die Zahl der Außenvesikel in einem Substrat ist aber nicht allein bestimmend für den Verpilzungsgrad und die daraus sich ergebende Innenvesikelzahl der Erbsenwurzeln:

Bei einem nur wenig verpilzten Versuch A XVIII (Verpilzungsgrad $D = 1,62\%$) ist die Zahl der Außenvesikel ebenso groß wie bei einem Versuch mit hohem Mycorrhizabefall A X (Verpilzungsgrad $D = 9,62\%$): $1,81\%$ Außenvesikel gegenüber $1,92\%$ Außenvesikel. Die Zahl der Innenvesikel beträgt bei A XVIII nur $10,1\%$, dagegen bei A X $77,8\%$.

Außeneinflüsse, von denen der maßgebliche und vorherrschende Einfluß der Sonneneinstrahlung gefaßt werden konnte (vgl. Abb. 1), bestimmen — wahrscheinlich über die Entwicklung der Erbsenpflanzen — den Verpilzungsgrad.

Es wurde schon gesagt, daß durch mehrmalige Bebauung eines Bodens — und, wie wir nun wissen, dadurch bedingte Vermehrung der infektionsfähigen Stadien — keine stärkere Verpilzung garantiert ist.

Bei der Zweitbepflanzung A VIII W kann eine viel größere Zahl von Außenvesikeln (vgl. Tab. 3) beobachtet werden, als bei der ersten Bepflanzung A VIII. (A VIII W 1,03% Außenvesikel, Verpilzungsgrad $D = 3,59\%$, A VIII 0,13% Außenvesikel, Verpilzungsgrad $D = 8,95\%$). Bei A VIII W beträgt die Zahl der Innenvesikel 11,00%, bei A VIII dagegen 34,27%.

Die hemmende Wirkung, die von den alten Wurzeln ausgeht, setzt das Wachstum der Wirtspflanze herab und behindert dadurch die volle Entwicklung des Pilzes. Nur in Versuchstöpfen mit kräftigen Pflanzen haben hohe Außenvesikelzahlen in der Regel auch hohe prozentuale Verpilzung und Vesikelzahlen zur Folge.

B. Künstlich veränderte Böden

Die in den Sand-Gartenerde-Mischungen M_1 und M_2 herabgesetzte Zahl von Infektionsstadien wurde nicht zum hemmenden Faktor für die Endverpilzung und die Zahl der Innenvesikel. Hier ist offensichtlich die Bodenstruktur für Wirts- und Pilzwachstum ausschlaggebender als die Zahl der infektiösen Stadien und dasselbe gilt für die Versuche in beschatteter Gartenerde.

Zu Versuchsbeginn ist die Zahl der Infektionsstadien genau die gleiche wie in den entsprechenden Kontrollen aus dem Jahresversuch. Im beschatteten Substrat wird die Außenvesikelbildung durch gute Belüftung gefördert (vgl. Tab. 7). Auch die Zahl der Innenvesikel übersteigt die der Kontrollen bis zum 9fachen (G II, A XXI, vgl. Tab. 7).

Ein Vergleich der Verpilzung und Vesikelbildung der einzelnen Pflanzen untereinander, vor allem zur Zeit der Blüte und reifen Frucht, zeigt, daß besonders kräftige Pflanzen, die in einem Substrat mit großer Außenvesikelzahl wachsen, außergewöhnlich hohen Verpilzungsgrad und große Vesikelzahl zeigen.

Abschließend läßt sich also sagen: Die Infektionsstadien im Boden sind für einen Mycorrhizabefall unerläßlich; aber ihre Zahl ist im durchwurzelten Bereich nie begrenzender Faktor für eine normal entwickelte Mycorrhiza. Ausreichende Sonneneinstrahlung und eine für hinreichende Luftführung günstige Bodenstruktur sind für eine starke Verpilzung und reichliche Vesikelbildung wesentlicher. Ob diese Faktoren sich direkt oder über ein günstiges Sproß- und Wurzelwachstum äußern, muß noch unentschieden bleiben. Sicher ist allerdings, daß die Entstehung der Außenvesikel aus den Innenvesikeln und eine reichliche Hyphenbildung im Boden von der Luftführung des Substrates abhängig sind.

V. Besprechung der Ergebnisse

JONES (1924), der außer JANSE (1897), MAGROU (1921) und PEYRONEL (1923) über *Papilionaceen*-Mycorrhiza gearbeitet hat, beschäftigte sich als einziger mit *Pisum sativum* und beschreibt die von uns beobachteten Innenvesikel mit einschichtiger Membran in sehr unterschiedlicher Form und Größe, wie sie von den umgebenden Zellen geprägt wird. Das Hineinpressen der Vesikel zwischen die Wirtszellen wurde außerdem von

JANSE bei anderen *Papilionaceen* und von McLENNAN (1926) ebenfalls für den Pilz von *Lolium* beschrieben. Bezüglich des Vesikelinhaltes beschreibt JONES — im Gegensatz zu unseren Beobachtungen — Vesikel mit Öltropfen. Diese Inhaltskörper beobachtete er ab und zu in den zuerst gebildeten Vesikeln und manchmal auch in alten Wurzeln beim Auflösen des Rindenparenchyms. JONES hält die Vesikel — durch PEYRONELS Beobachtungen angeregt — auch für „fruiting structures“, eventuell für Sporangien. Ebenso vermutet M. STAHL (1949), daß die Vesikel der *Marchantia*-Mycorrhiza Vorstadien einer Sporenbildung darstellen, die vielleicht im lebenden Thallus der Wirtspflanze nicht zur Entwicklung kommen können. Sie fand keine Stadien, die auf eine Weiterentwicklung in diesem Sinne schließen ließen.

Die zuerst von JANSE (1897) ausgesprochene Hypothese, daß die Vesikel auskeimen, wenn das Wurzelgewebe tot ist und dann neue Wurzeln infizieren können, wurde von uns für die Erbsenmycorrhiza bewiesen. Allerdings kann keine sichere Aussage gemacht werden, ob eine Infektion ohne Zwischenschaltung der Außenvesikel möglich ist.

Bei den meisten Mycorrhizaformen sind nur wenig Einzelheiten über die Pilzstadien außerhalb des Wurzelgewebes bekannt. Es wird aber von vielen Autoren angenommen, daß bei der phycomycetoiden Mycorrhiza nach Absterben des Wurzelgewebes Vesikel überleben, die wahrscheinlich den Pilz reproduzieren können (PEYRONEL 1923, 1924, McLUCKIE and BURGESS 1932, VAN DER PIJL 1934, TRUSCOTT 1934, BURGEFF 1943, NEILL 1944). Nur BUTLER (1939) fand in der Umgebung von *Abutilon*-Wurzeln Vesikel mit Hyphen und an diesen terminal kleine, runde, dünnwandige, von den Hyphen nicht abgetrennte sporenähnliche Körper. Diese Stadien und die von uns beschriebenen Vesikel und Außenvesikel der *Pisum*-Mycorrhiza entsprechen sich möglicherweise. BUTLER konnte die Weiterentwicklung der sogenannten sporenähnlichen Körper nicht beobachten.

Vesikel im Boden beschreiben auch BUSICH (1913) und PEYRONEL (1923). BUSICH erkannte sie ebenfalls als Infektionsstadien der *Asclepiadaceen*-Mycorrhiza, konnte ihre Herkunft aber nicht ermitteln.

Eine ganz andere Art von Mycorrhiza-Fruchtkörpern im Boden, deren Herkunft ungeklärt bleibt, beschreibt MOSSE (1956) für *Fragaria vesca*. Neben den Vesikeln in der Wurzel beobachtete sie in der Erde lockere Hyphenknäuel, die Sporen umschließen. Die äußeren, dünnwandigen Hyphen dieser Fruchtkörper verlaufen im Boden und haben Verbindung mit *Fragaria*-Wurzeln. Die inneren dickwandigen Hyphen umgeben den Bereich der Sporen, welche aus diesen entstehen und sich durch eine Querwand absetzen. Die Verfasserin nennt sie daher Chlamydosporen und konnte mit ihnen Wurzeln infizieren.

Der von uns klargestellte Zusammenhang zwischen Innen- und Außenvesikeln kann mit diesen Ergebnissen schwerlich verglichen werden, da die Entstehung der Fruchtkörper im Boden unbekannt ist;

größenordnungsmäßig entsprechen die von MOSSE abgebildeten Sporen den Innenvesikeln der Erbsenmycorrhiza. Querwände jedoch beobachteten wir weder bei Innen- noch bei Außenvesikeln, wie überhaupt — im Gegensatz zur *Fragaria*-Mycorrhiza — der *Pisum*-Pilz unseptiert ist.

So werden also für die vegetative Vermehrung der endotrophen Mycorrhiza bis jetzt zwei Möglichkeiten bewiesen bzw. behauptet: 1. Vesikel überleben das Wirtsgewebe und können im Boden Dauerstadien bilden, die über austreibende Hyphen Neuinfektionen verursachen. 2. Vesikel fungieren als Sporangien, d. h. sie bilden Sporen innerhalb oder außerhalb des lebenden oder toten Wirtsgewebes.

Generative Fortpflanzungsstadien konnten wir nicht beobachten. Solche wurden bei *Burmannia*, *Epirrhizanthes* und *Dryopteris linnaeana* von VAN DER PIJL (1934) und SKEPPSTEDT (1952) beobachtet. Sie gleichen Vesikeln, haben aber zahlreiche Kerne und konnten nicht einwandfrei als Oogonien erkannt werden; Antheridien fehlten, so daß keine Befruchtung beobachtet werden konnte.

Ebenso beobachteten wir keine vollständige Resorption des Vesikelinhaltes vom Pilz (DEMETER 1923) oder von der Pflanze (SHIBATA 1902, GALLAUD 1905, WEST 1917, LHNELL 1939), die auf die Funktion der Vesikel als Reservestoffbehälter schließen läßt.

Unsere Feststellung, daß nur durchwurzelter Boden infektiös wirkt, wird von MELIN (1927), BURGESS (1939) und BJÖRKMAN (1942) bestätigt. Die Angabe von ENDRIGKEIT (1937), daß Mycorrhiza sich noch in einer Tiefe von 1 m vorfindet, kann nur dann als sicher gelten, wenn der Boden bis zu dieser Tiefe durchwurzelt war.

Wir erkannten, daß die Bodenstruktur für die Entwicklung der Erbsenmycorrhiza von wesentlicher Bedeutung ist. Ein ausreichendes Porenvolumen ist Vorbedingung für eine gute Belüftung des Wurzelsystems. WINTER (1939) machte für das Wachstum der Laufhyphen von *Ophiobolus graminis* die gleiche Beobachtung. Zunehmende „Bodenfestigung“ hemmt das Wachstum der *Ophiobolus*-Hyphen. In Übereinstimmung mit GARRETT (1936) führt er diese Hemmwirkung auf Verschlechterung der Bodendurchlüftung zurück. Eine Abnahme der Durchlüftung mit zunehmender Feinkörnigkeit des Substrates zeigen die Zahlen für das Porenvolumen von Gartenerde und Modellböden M_1 und M_2 , die oben angegeben sind. GARRETT (1937) konnte entsprechend durch Auflockerung des Bodens mit Baumwolle das Wachstum der *Ophiobolus*-Hyphen fördern.

Man muß annehmen, daß Sauerstoffmangel das Wachstum der Laufhyphen von *Ophiobolus* und ebenso das Wachstum und die Außenvesikelbildung der Erbsenmycorrhiza hemmt. Die Hemmung von Hyphenwachstum und Sporenbildung in schlecht durchlüfteten Böden könnte aber auch durch Anreicherung von Kohlendioxyd bedingt sein (GARRETT 1936, HAWKER 1950).

Die Beeinflussung des Pflanzenwachstums durch angereichertes Kohlendioxyd beobachtete schon DE SAUSSURE (aus KRAMER 1949): Erbsenpflanzen welken, wenn reines Kohlendioxyd oder Gasmischungen, die $\frac{2}{3}$ oder $\frac{3}{4}$ Kohlendioxyd enthalten, durch die Nährlösung geleitet werden, in der die Pflanzen wachsen. KOSSEWITCH (1892) stellte fest, daß eine Atmosphäre, die 80% Kohlendioxyd und 20% Sauerstoff enthält, Erbsen, die im Boden wachsen, innerhalb von 2 Tagen zum Welken bringt. Eine Mischung von 80% Wasserstoff und 20% Sauerstoff dagegen verursacht kein Welken. Daraus geht hervor, daß Kohlendioxyd der ausschlaggebende Faktor ist (aus KRAMER 1949).

Wir konnten bei allen Versuchen in Gartenerde aus dem Freiland, deren Porenvolumen durch häufiges Gießen im Laufe des Versuches abnimmt, von Zeit zu Zeit plötzlich Welkeerscheinungen bei den Erbsenpflanzen feststellen, die, solange noch keine irreversible Schädigung stattgefunden hatte, durch Auflockern der Erde im Laufe eines Tages behoben werden konnte. Wahrscheinlich macht sich auch hier der schädliche Einfluß der Kohlendioxyd-Anreicherung bemerkbar.

KRAMER (1949) gibt an, daß die Aufnahme von Mineralsalzen bei der Erbse durch Anreicherung von Kohlendioxyd im Wurzelbereich stärker herabgesetzt wird als die von Wasser. Dadurch bleiben Blattfläche und Chlorophyllgehalt unterentwickelt, wodurch andererseits die Assimilationsintensität — und damit die Bautätigkeit der Pflanze — beeinträchtigt wird (LUNDEGÅRDH 1957).

Wie sehr aber die Entwicklung der Mycorrhiza von einem ausreichenden Wachstum im Sproß- und Wurzelsystem abhängig ist, erwähnten wir immer wieder. Wir faßten den Faktor der Sonneneinstrahlung, der sich während des verstärkten Baustoffwechsels der Wirtspflanze — vor der Blüte — besonders stark auswirkte. Die gleiche Beobachtung machten M. STAHL (1949) und SIEVERS (1953) für die endotrophe Mycorrhiza von *Marchantia* und von vornehmlich *Solanaceen*. Eine Verpilzung im Gewächshaus war im Winter wesentlich schwerer zu erzielen als im Sommer, und in einem schattig gehaltenen Mooshaus war die Mycorrhiza-Entwicklung wesentlich schwächer bzw. sie fehlte ganz im Gegensatz zu einem unbeschatteten Gewächshaus.

Die ektotrophe Mycorrhiza spricht ebenso empfindlich auf Schwankungen der Lichtintensität an, wie HATCH (1937) und BJÖRKMAN (1940—42) feststellten. Auch nach BJÖRKMAN (1944) soll der Lichteinfluß nicht unmittelbar auf das Pilzwachstum einwirken. Er nimmt an, daß durch günstige Beleuchtungsbedingungen die Assimilation gefördert wird und der Überschuß an Kohlenhydraten dem Endophyten zugute kommt. Er beweist diese Hypothese, indem er durch Ringelung den Abwärtstransport der Kohlenhydrate im Siebteil von *Pinus* unterbindet, und dadurch die Mycorrhiza-Entwicklung um so stärker unterbindet, je länger der Stofftransport unterbrochen war. BJÖRKMAN

bestätigte damit in situ die Ergebnisse von MELIN (1925) und NORKRANS (1944), die zeigen konnten, daß Mycorrhiza-Pilze in Reinkultur nur lösliche Kohlenhydrate, vornehmlich Glucose, verwerten können.

In den Lehrbüchern wird die Mycorrhiza ganz allgemein als „Symbiose“ bezeichnet. SCHAEDE (1948) ist der Meinung, daß die Mycorrhiza je nach den morphologischen Gegebenheiten einen mehr eusymbiotischen oder dyssymbiotischen Charakter haben kann. Er weist darauf hin, daß ektotrophe Mycorrhiza zum Nährsalztransport der Wirtspflanze beiträgt, während für die endotrophe Mycorrhiza — mit Ausnahme der Orchideen — eine solche Leistung bis jetzt nicht erwiesen wurde. Das Pilz-Wirt Verhältnis bei der Erbsenmycorrhiza wurde hinsichtlich der Funktion der Mycorrhiza beim Nährsalztransport nicht untersucht, so daß wir hier eine Entscheidung gemäß der Definition von SCHAEDE nicht treffen können.

Wir versuchten aber das Verhältnis Mycorrhizapilz — Erbsenpflanze über einen eventuellen Stoffaustausch der beiden Partner zu beurteilen. Wenn die Befunde BJÖRKMANS auf die endotrophe Mycorrhiza, speziell die Erbsenmycorrhiza, zu übertragen sind, so nimmt der Endophyt am Kohlenhydrat-Stoffwechsel des Wirtes teil.

Andererseits deuten unsere Beobachtungen bei der Sporangienbildung aus den Arbuskeln darauf hin, daß eine Vermischung des Pilz- und des Wirtsplasmas stattfindet, die BURGEFF (1909) auf Plasmoptyse der Pilzhypphen infolge ihrer hohen Zuckerkonzentration, DEMETER (1923) auf die geringe Säurekonzentration der Wirtszelle zurückführt. Im letzten Stadium, d. h. nach der Resorption der stark färbbaren Fällungsprodukte im Plasma des Wirtes, kann die Phagocytschicht, wie BURGEFF (1943) sie nennt, kaum noch von pilzfreen Wurzelzellen unterschieden werden. Demnach übernimmt die Erbsenwurzel Eiweißsubstanz des Pilzes, und dieser gegenseitige Austausch berechtigt uns vielleicht, im Falle der Erbsenmycorrhiza von echter Symbiose zu sprechen.

VI. Zusammenfassung

1. Die vegetative Entwicklung des Erbsen-Mycorrhiza-Endophyten konnte klargestellt werden. Als Infektionsstadien im durchwurzelten Bereich des Bodens wurden Außenvesikel gefunden, die aus den in der Wurzelrinde gebildeten Innenvesikeln entstehen.

2. Vorbedingung für eine starke Verpilzung und eine entsprechend reichliche Innen- und Außenvesikelbildung ist ein kräftiges Sproß- und Wurzelwachstum.

3. Der Einfluß der Sonneneinstrahlung auf die Mycorrhiza-Entwicklung zeigt sich wahrscheinlich über den Kohlenhydrat-Haushalt des Wirtes.

4. Dagegen wirkt die Bodenstruktur (Modellböden und beschattete Gartenerde) sowohl auf die Entwicklung der Pflanze als auf die Hyphenentwicklung des Pilzes im Boden und wahrscheinlich auch in der Wurzel.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

- BJÖRKMAN, E.: Medd. Stat. Skogsförsöksanst. **32**, 23—74 (1940). Engl. Zus.fass. — Symb. Botanicæ Upsaliensæ **6**, 1—190 (1942). — Sv. bot. Tidskr. **38**, 1—14 (1944). — BURGEFF, H.: Die Wurzelpilze der Orchideen, ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze. Jena: G. Fischer 1909. — Naturwissenschaften **47/48**, 558—567 (1943). — BURGESS, A.: New Phytologist **35** (2), 117—131 (1936); **38** (3), 273—283 (1939). — Soil fungi and root infection. (A review.) Broteria Vol. VIII, XXXV, 64—81 (1939). — BUSICH, E.: Verh. zool.-bot. Ges. Wien **63**, 240—264 (1913). — BUTLER, E. J.: Trans. Brit. Mycol. Soc. **22**, 274—301 (1939).
- DEMETER, K.: Flora (Jena) **116**, 405—456 (1923).
- ENDRIGKEIT, A.: Bot. Archiv **39**, 1—87 (1937).
- GÄUMANN, E., O. JAAG u. ST. ROTH: Ber. Schw. Bot. Ges. **55**, 270—277 (1945). — GALLAUD, J.: Rev. gén. Bot. **17**, 66—85 (1905). — GARRETT, S. D.: Ann. appl. Biol. **23**, 667—699 (1936); **24**, 747—751 (1937a). — GROOM, P.: Ann. of Bot. IX, 327—361 (1895).
- HATCH, A. B.: The physical basis of mycotrophy in Pinus. Black Rock Forest Bull. No. 6, 168 pp (1937). — HAWKER, L. E.: Physiology of fungi. London E. C. 4: Univ. of London Press, Warwick Square, 1950.
- JANSE, J. M.: Ann. Jard. bot. Buitenzorg XIV, 53—201 (1897). — JOHANSEN, D. A.: Plant Microtechnique. New York and London: Mc Graw-Hill Book Company Inc. 1940. — JONES, F. R.: Journ. Agricult. Res. **29**, 459—470 (1924).
- KELLEY, A. P.: Mycotrophy in plants. Mass. U.S.A.: Chronica Botanica Company Waltham 1950. — KLAPP, E.: Lehrbuch des Acker- und Pflanzenbaues. Berlin SW 68: Paul Parey 1951. — KRAMER, P. J.: Plant and soil water relationship. New York, Toronto, London: Mc Graw-Hill Book Company Inc. 1949.
- MCLENNAN, E.: Ann. of Bot. **40**, 43—65 (1926). — LIHNELL, D.: Symb. Botanicæ Upsaliensæ **3**, 1—141 (1939). — MCLUCKIE, J., and A. BURGESS: Proc. Linnean, Soc. N.S.Wales LXII, 291—312 (1932). — LUNDEGARDH, H.: Klima und Boden in ihrer Wirkung auf das Pflanzenleben. Jena: G. Fischer 1957.
- MAGROU, J. M.: Ann. d. Sci. nat. 10me sér., Bot. **3**, 181—296 (1921). — Rev. gén. Bot. **53**; 49—77 (1946). — MELIN, E.: Untersuchungen über die Bedeutung der Baummykorrhiza. Jena: G. Fischer 1925. — Studien över barrträdsplantans utveckling i räum. (aus Björkman 1942). Medd. Stat. Skogsförsöksanst. **23**, (1927) (dtsh. Zus.fass.). — MOLLBERG, A.: Jena. Z. Naturwiss. **17**, 519—536 (1884). — MOSSE, B.: Ann. of Bot. XX, 349—362 (1956).
- NABEL, K.: Arch. Mikrobiol. **10**, 515—541 (1939). — NEILL, J. C.: New Zealand Journ. Sci. & Tech. A. **35**, 191—201 (1944). — NORKRANS, B.: Sv. bot. Tidskr. **38**, 121—122 (1944).
- PEYRONEL, B.: Bull. Soc. Mycol. France **39**, 119—126 (1923). — Riv. Biol. **5**, 463—485 (1923); **6**, 17—53 (1924) (ref. Bot. Zbl. **149**, 222, 1926). — VAN DER PIJL, L.: Rec. Trav. bot. néerl. **31**, 761—779 (1934).
- REED, H. S., and T. FREMONT: Phytopathology XXV, 645—647 (1935). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz 1948.
- SCHAEDE, R.: Die pflanzlichen Symbiosen. Jena: G. Fischer 1948. — SHIBATA, K.: Jb. Bot. **37**, 643—684 (1902). — SIEVERS, E.: Arch. Mikrobiol. **18**, 289—321 (1953). — SKEPPSTEDT, A.: Sv. bot. Tidskr. **46**, 454—481 (1952). — STAHL, M.: Planta (Berl.) **37**, 103—148 (1949). — STRASBURGER, E.: Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 26. Aufl. Stuttgart: G. Fischer 1954.
- TRUSCOTT, J. H. L.: Canad. J. of Research **11**, 1—17 (1934).
- WEST, C.: Ann. of Bot. XXXI, 77—99 (1917). — WINTER, A. G.: Z. Pflanzenkrkh. **49**, 513—559 (1939). — Phytopathol. Zeitschr. **17**, 421—432 (1951). — VAN WISSE-LINGH, C.: Jb. Bot. XXXI, 619—687 (1898).

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Mikrochemisches Praktikum

Von G. Gorbach, Graz. (Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis. Herausgegeben von H. Mayer-Kaupp.) Mit 72 Abbildungen im Text. VIII, 123 Seiten 8°. 1956.

Steif geheftet DM 15,—

Inhaltsübersicht: Vorwort. — Einleitung. — Die Waage. — Beschreibung und Anwendung mikrochemischer Arbeitsgeräte. — Qualitative Mikrochemie. — Präparative Mikrochemie. — Quantitative Mikrochemie. — Bestimmung physikalischer Konstanten. — Methodik der Anreicherung von Spurenelementen in der Spektralanalyse. — Literaturverzeichnis. — Sachverzeichnis.

Aus den Besprechungen: Gorbach hat sich in besonderem Maße um den Ausbau der mikrochemischen Methodik verdient gemacht. Zahlreiche Apparate und kleinere Hilfsmittel sind in seinem Laboratorium entwickelt worden. Außerdem hatte er Gelegenheit, in vielen Kursen didaktische Erfahrungen zu sammeln. Gorbach ist daher der berufene Autor zur Schilderung der mikrochemischen Methodik, ohne welche die moderne Chemie, insbesondere Biochemie nicht mehr denkbar wäre. . . . Das Buch ist ein unentbehrliches Hilfsmittel für das Laboratorium und sollte insbesondere in keinem klinisch-chemischen Laboratorium fehlen.

„Klinische Wochenschrift“

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Handbuch der Pflanzenphysiologie

Encyclopedia of Plant Physiology

Herausgegeben von W. Ruhland, Unterdeufstetten, in Gemeinschaft mit E. Ashby, J. Bonner, M. Geiger-Huber, W. O. James, A. Lang, D. Müller, M. G. Stälfelt. In 18 Bänden. Jeder Band ist einzeln käuflich.

Soeben erschienen:

Band X:

Der Stoffwechsel sekundärer Pflanzenstoffe

The Metabolism of Secondary Plant Products

Bearbeitet von B. Arreguín, C. E. Ballou, F. Blank, W. C. Evans, T. A. Geissman, T. W. Goodwin, A. J. Haagen-Smit, A. Heusner, J. G. Kisser, D. R. Kreger, H. Mader, W. Mayer, O. Moritz, F. F. Nord, P. Schwarze, S. Shibata, G. de Stevens. Redigiert von K. Paech † und P. Schwarze. Mit 57 Abbildungen. XV, 834 Seiten Gr.-8°. 1958.

Ganzleinen DM 198,—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes Subskriptionspreis

Ganzleinen DM 153,40

Inhaltsübersicht: Einführung. — **Die Terpenoide.** Übersicht über Terpenoide. Die niederen Terpene (besonders ätherische Öle und Harze). Phytosterine. Carotenoids. Rubber and latex. — **Wachs, Cutin, Kork.** Wax. Cutin. Kork. — **Anthocyanins, flavones, xanthones.** — **Pflanzengerbstoffe.** — **Lignins and lignification.** — **Hydroaromatische Verbindungen und weitere Benzolderivate.** Inositol and related compounds (cyclitols). Phenole, Chinone und die biogene Bildung von Benzolkernen. The metabolism of phenylpropane derivatives in plants. — **Especial compounds of lichens.** — Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis. — Namenverzeichnis — Author Index. — Sachverzeichnis (Deutsch-Englisch). — Subject Index (English-German).

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG